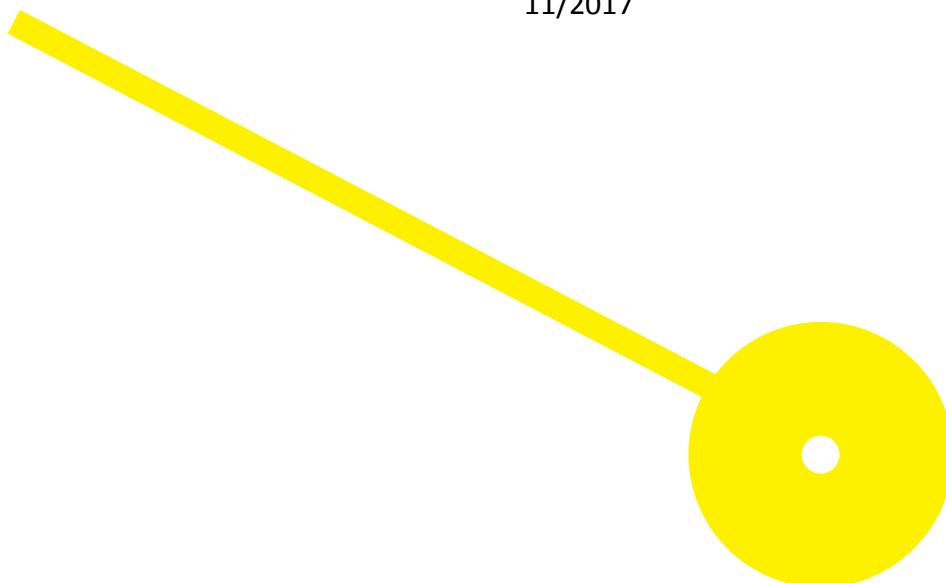


**Estudo da Atividade Antitumoral de
Líquidos Iónicos com base em antibióticos
Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas**

Maria de Fátima Martins Couteiro

11/2017



Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em
Fluoroquinolonas

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DO PORTO

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Maria de Fátima Martins Couteiro

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iónicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Ricardo Ferraz, Escola Superior Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, da Professora Doutora Cristina Prudêncio, Escola Superior de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto e do Professor Doutor João Costa-Rodrigues, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto.

Novembro de 2017

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em
Fluoroquinolonas

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.” (Walter S.Landor)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor Ricardo Ferraz por ter aceite orientar o meu trabalho e por todo o tempo despendido durante estes dois anos.

Em segundo lugar, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao Professor João Rodrigues por ter aceite colaborar no meu projeto e pelo apoio incondicional que me deu no decorrer do mesmo. Também por me ter recebido prontamente na Faculdade de Medicina Dentária do Porto, de forma a conseguir realizar parte do meu trabalho lá.

Agradeço também à Professora Cristina Prudêncio e à Professora Mónica Vieira o incentivo e as sugestões dadas, bem como todo o apoio.

À Escola Superior de Saúde do Porto, agradeço o esforço em agilizar as mudanças de estabelecimento de forma a melhorar a qualidade do trabalho na área da Investigação.

Agradeço também à minha colega, companheira e amiga Maria João Cerqueira toda a paciência e toda a colaboração na realização deste projeto.

Aos meus pais, para esses nem há palavras, se não fossem eles, não existiria Mestrado e muito menos Tese de Mestrado em Bioquímica em Saúde.

Por último, agradeço a todos os meus familiares, amigos e colegas de trabalho que mais ou menos presentes me deram força e coragem para lutar até ao fim sem desistir.

A todos, um muito obrigada!

Resumo

Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais orgânicos, cujo ponto de fusão é inferior a 100°C. Estes compostos têm sido alvo de uma ampla investigação, uma vez que, possuem diversas características físicas, químicas e biológicas interessantes e que podem ser ajustáveis. Estas características fazem com que seja possível a sua aplicação em diversas áreas, como a Química, Indústria Farmacêutica e a Biotecnologia.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da atividade bacteriana e fúngica de líquidos iônicos baseados em beta-lactâmicos e fluoroquinolonas, em que se pretende determinar se LIs baseados em fluoroquinolonas e beta-lactâmicos terão atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, resistentes e sensíveis e ainda um modelo de levedura.

Este trabalho vai avaliar também o estudo da viabilidade/proliferação de determinados LIs nas linhas celulares RKO (neoplasia do cólon), T47D (neoplasia da mama), MG63 (neoplasia do osso), A459 (neoplasia do pulmão), Hep62 (neoplasia do fígado) e fibroblastos e ainda compreender o modo de atuação das vias de sinalização nos líquidos iônicos em estudo e nas linhas celulares RKO (neoplasia do cólon), T47D (neoplasia da mama), MG63 (neoplasia do osso), A459 (neoplasia do pulmão), Hep62 (neoplasia do fígado) e fibroblastos.

No estudo da atividade bacteriana, os LIs irão ser aplicados em estirpes bacterianas, nas quais estarão incluídas algumas estirpes resistentes.

Os resultados obtidos no presente trabalho destacam o potencial destes compostos como novos fármacos, e a importância de outros estudos para compreender os mecanismos pelos quais eles atuam, tanto em células como em bactérias ou em fungos.

Palavras-chave: Líquidos Iônicos, Antibacterianos, Atividade anti-tumoral, atividade bacteriana, vias de sinalização.

Abstract

Ionic Liquids (LIs) are organic salts whose melting point is below 100 ° C. These compounds have been the subject of extensive research since they have physical, chemical and biological characteristics that can be adjustable. These characteristics make it possible to be applied in several areas, such as Chemistry, Pharmaceutical Industry and Biotechnology.

The aim of the present work is to study the bacterial and fungal activity of ionic liquids based on beta-lactams and quinolones. It is intended to determine if LIs based on quinolones and beta-lactams will have activity against Gram-positive and Gram-negative, resistant and sensitive bacteria and still a model of yeast.

This work will also evaluate the viability / proliferation of certain ionic liquids in the RKO (colon cancer), T47D (breast cancer), MG63 (bone cancer), A459 (lung cancer), Hep62 (liver cancer) and fibroblasts, and also to understand the mode of action of the signaling pathways in the ionic liquids in the RKO (colon neoplasia), T47D (breast neoplasia), MG63 (bone neoplasia), A459 (lung neoplasia) , Hep62 (liver neoplasm) and fibroblasts.

In the study of bacterial activity, the Ionic Liquids will be applied in bacterial strains, in which some resistant strains will be included.

The results obtained in the present work highlight the potential of these compounds as new drugs, and the importance of other studies to understand the mechanisms by which they act, both in cells and in bacteria or fungi.

Key words: Ionic liquids, Antibacterial, Anti-tumor activity, bacterial activity, signaling pathways.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo.....	VI
Abstract	VII
Índice.....	VIII
Índice de Abreviaturas	X
Índice de Tabelas.....	XI
Índice de Figuras	XII
CAPÍTULO I	1
Líquidos Iônicos.....	1
1. Líquidos Iônicos	2
1.1 Líquidos Iônicos como Agentes Farmacêuticos Ativos	5
1.2 Líquidos Iônicos como antibacterianos.....	8
1.2.1 Bactérias e antibacterianos	9
1.3 Leveduras – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4 Resistência aos antibacterianos	13
1.5 Antibacterianos	16
1.5.1 Beta lactâmicos.....	16
1.5.2 Fluoroquinolonas.....	17
1.6 Líquidos Iônicos como agentes antitumorais.....	18
1.7 Processo de formação e desenvolvimento neoplásico	22
1.7.1 Vias de sinalização	25
1.8 Planejamento e Objetivos da Tese.....	27
CAPÍTULO II	28
Material e Método	28
2. Material e Métodos.....	29
2.1 Líquidos Iônicos.....	29
2.2 Estudo em bactérias e leveduras	31
2.2.1 Preparação das Soluções	31
2.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	31
2.3 Estudos em linhas celulares	32

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

2.3.1 Culturas celulares	33
2.3.2 Quantificação da viabilidade/proliferação celular	34
2.3.3 Determinação dos valores de IC50	34
2.4 Análise Estatística	34
CAPÍTULO III	35
Resultados	35
3. Resultados	36
3.1 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória em Bactérias	36
3.2 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória em Leveduras.....	37
3.3 Viabilidade/ Proliferação Celular	38
3.4 Vias de sinalização Celular utilizadas no estudo da atividade celular.....	42
CAPÍTULO IV	51
Discussão	51
4. Discussão	52
CAPÍTULO V	56
Conclusão	56
5. Conclusão	57
CAPÍTULO VI	58
Bibliografia	58
5. Bibliografia.....	59

Índice de Abreviaturas

Lis	Líquidos Iônicos
IFA	Ingredientes Farmacêuticos Ativos
CMI	Concentração Mínima Inibitória
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetil-murâmico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TSB	Tryptic Soy Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MFC	Concentração Fungicida Mínima
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagressiva
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CE50	Concentração Máxima Inibitória Média
DL50	Dose Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
CLSI	Laboratório Clínico Standard Institute
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DO	Densidade Ótica
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
EUA	Estados Unidos da América
Ref	Referência
YEPD	Yeast extract peptone dextrose
α – MEM	α – modified minimum essential medium
FBS	Soro de Bovino Fetal
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estudos da atividade anti-tumoral de LIs em diferentes linhas celulares [adaptado de Dias, A 2017]	19
Tabela 2 - Vias de sinalização em estudo, inibidor e concentração utilizada.....	33
Tabela 3 - Tabela representativa das taxas de crescimento das bactérias ATCC 6593, MRSA, ATCC 25911, CTX M2, CTX M9.	36
Tabela 4 - Tabela representativa das taxas de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> . ..	37
Tabela 5 - Valores de IC50 obtidos após 1 dia de cultura.....	38
Tabela 6 - Valores de IC50 obtidos ao 3º dia de cultura	39
Tabela 7 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular dos fibroblastos.	42
Tabela 8 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular RKO.	44
Tabela 9 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular T47D.	45
Tabela 10 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular MG63.	46
Tabela 11 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular A549.	47
Tabela 12 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular Hep62.....	48

Índice de Figuras

Figura 1 - Gerações dos líquidos iônicos.....	3
Figura 2 - Esquema representativo das estruturas das formas sólidas dos IFAs [adaptado de Lu, 2012] (Lu, 2012b)	6
Figura 3 - Abordagem multi-camada para a seleção de sais farmacêuticos. [adaptado de Lu, 2012] (Lu, 2012b)	7
Figura 4 - Processo de Resistência aos antibióticos (adaptado de (Marshal & Levy, 2004))	15
Figura 5 - Exemplo de antibiótico Beta-lactâmico, penicilina, onde se consegue ver o anel beta-lactâmico.	16
Figura 6 - Exemplo de Fluoroquinolona - ciprofloxacina	17
Figura 7 - Processo da evolução tumoral.	24
Figura 8 - Formação do cancro (adaptado de (Siddiqui et al., 2015)).....	25
Figura 9 - Compostos em estudo no presente trabalho.....	30
Figura 10 - Gráficos ilustrativos dos resultados obtidos pelo composto MD ao dia 1 e ao dia 3	41
Figura 11 - Gráficos ilustrativos dos resultados obtidos relativamente às vias de sinalização pelo composto MD ao dia 1 e ao dia 3.	50

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em
Fluoroquinolonas

CAPÍTULO I

Líquidos Iónicos

1. Líquidos Iônicos

Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais orgânicos, cujo ponto de fusão se encontra abaixo dos 100°C. Na sua composição apresentam sempre um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico (Marrucho, Branco, & Rebelo, 2014; Petkovic, Seddon, Rebelo, & Pereira, 2011). Os principais catiões orgânicos utilizados na constituição dos LIs são o imidazólio, piridínio, amônio, fosfônio e guanidínio (Marrucho et al., 2014). Os aniões podem ser de natureza orgânica ou inorgânica com espécies como halogenetos, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, bis(trifluorometilsulfonil)imida, acetato e dicianamida (Bufalo, Radosevic, Redovnikovic, Halambec, & Srcek, 2014); (Ferraz, Branco, Prudencio, Noronha, & Petrovski, 2011; R. Ferraz et al., 2015). As diferentes combinações de catiões e aniões permitem a obtenção de compostos com características físico-químicas potencialmente interessantes em diversos contextos, como por exemplo, elevada estabilidade térmica e química, baixa inflamabilidade, baixa volatilidade e solubilidade (Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2014).

Nos últimos anos estes compostos têm sido muito estudados, sendo atualmente classificados em três gerações, de acordo com as suas propriedades e aplicações (figura 1). A primeira geração permite agrupar os LIs tendo em consideração as suas propriedades físicas, como é o caso do ponto de fusão, densidade, viscosidade, estabilidade térmica, condutividade e hidrofobicidade. Por sua vez, a segunda geração engloba as propriedades químicas, como por exemplo a utilização como solventes em sínteses orgânicas, entre outras. A terceira geração é a mais recente e permite o uso de Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) na produção de LIs com atividade biológica - agrupa os LIs com base nas suas propriedades físico-químicas e biológicas (Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2014).

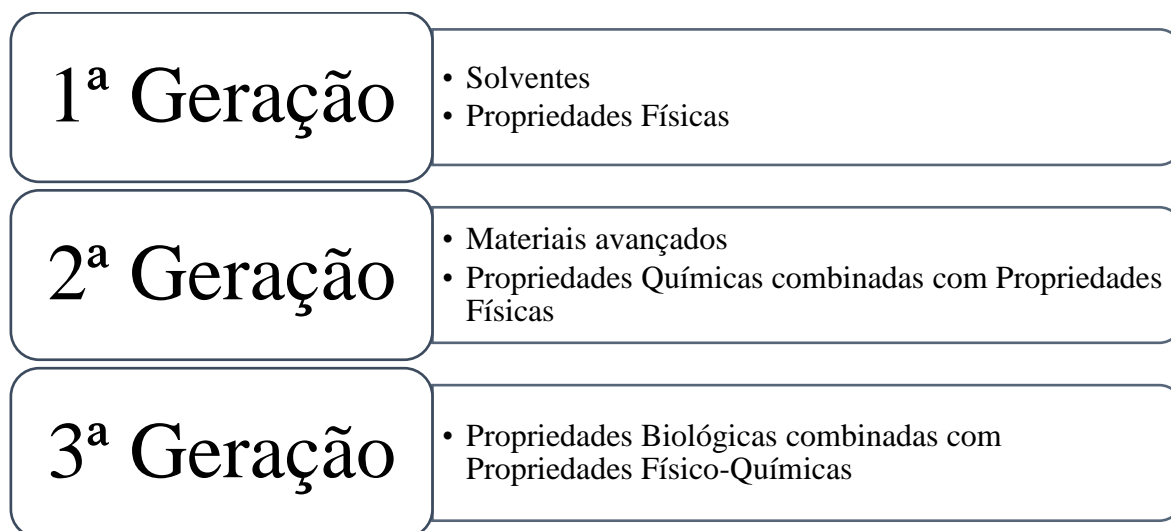


Figura 1 - Gerações dos líquidos iônicos.

Há mais de 100 anos Paul Walden já tinha descrito um composto com as características de líquido iônico – o nitrato de etilamônio com ponto de fusão de 12°C (Petkovic et al., 2011). No entanto, só no final do século XX, é que a comunidade científica se começou a interessar por essas propriedades. Na última década, devido principalmente ao seu potencial como solventes e reagentes, o estudo acerca dos mesmos tem vindo a intensificar-se, sendo evidente o crescente aumento de publicações científicas com o termo Lis (Petkovic et al., 2011).

Atualmente os Lis apresentam inúmeras aplicações, em contextos como a separação e extração de compostos químicos, como catalisadores, na produção de matérias e em tecnologia de análise e energia (Wang et al., 2005). A sua aplicabilidade tem vindo a ser cada vez mais investigada, verificando-se um elevado interesse por parte de diversas áreas em usufruir destes compostos, como é o caso da química, biotecnologia e indústria farmacêutica (Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2014). Na realidade, o facto de estes compostos apresentarem uma composição que pode ser manipulada, adequando-os e adaptando-os a cada necessidade tem permitido a sua utilização em novos cenários. Recentemente, têm vindo a ser descritos Lis com atividade biológica, mais uma especificidade destes compostos para adicionar às anteriormente mencionadas, permitindo assim, a aplicação destes compostos na indústria farmacêutica (Ferraz et al., 2012; Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2014). Tem sido demonstrado que alguns Lis

podem atuar como possíveis agentes terapêuticos diminuindo os efeitos adversos dos tratamentos convencionais atualmente praticados (Frade, Matias, Branco, Afonso, & Duarte, 2007; Frade et al., 2010; Kumar & Malhotra, 2009; Malhotra, Kumar, Velez, & Zayas, 2014). Porém, o uso desta classe de compostos nesta área é ainda limitado devido à escassez de informações acerca da sua toxicidade, pureza e biodegradação (Marrucho et al., 2014). Apesar de os LIs serem considerados como solventes verdes, do ponto de vista biológico tem sido dado um destaque crescente a outras propriedades, tais como a biodisponibilidade e toxicidade que são importantes determinantes da potencial aplicabilidade dos LIs como potenciais fármacos em diferentes contextos patológicos (Ferraz et al., 2011).

Em maior detalhe, diversos trabalhos publicados têm demonstrado que os LIs apresentam um elevado potencial de aplicabilidade para a indústria farmacêutica, pois poderão superar os obstáculos de formulação de IFAs no estado sólido (Ferraz et al., 2011). Adicionalmente, a necessidade de desenvolver novas terapias eficientes e inovadoras em diversos contextos patológicos, nomeadamente ao nível da oncologia, é outra problemática subjacente à indústria farmacêutica, com amplo potencial de aplicação dos LIs (Ferraz, et al., 2011).

1.1 Líquidos Iônicos como Agentes Farmacêuticos Ativos

Os IFAs são um dos principais focos de atenção da medicina moderna, formando a base de muitos tratamentos inovadores em uso ou em desenvolvimento. Um IFA é definido como uma ou mais substâncias combinadas num produto farmacêutico final, as quais conjugadas induzem atividade farmacológica, ou de outra forma podem ter efeito direto no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças. Podem ainda atuar ao nível do restabelecimento, correção ou modificação das funções fisiológicas no ser humano (Stoimenovski, MacFarlane, Bica, & Rogers, 2010).

Os custos associados ao desenvolvimento de novos IFAs é muito elevado, não só devido ao registo da patente, mas também devido ao tempo necessário para o estudo dos compostos em questão até que estes sejam aprovados, ao desenvolvimento de novos procedimentos sintéticos e também ao facto de nem todos os estudos efetuados terem sucesso (Marrucho et al., 2014; Smiglak et al., 2014).

Atualmente, cerca de 50% dos fármacos disponíveis são sais orgânicos sob a forma sólida. O processo de desenvolvimento de um sal, designado salificação, é de extrema relevância uma vez que pode influenciar de forma decisiva a sua solubilidade, dissolução, estabilidade e higroscopicidade (Stoimenovski et al., 2010).

Os IFAs podem existir em diversas formas sólidas independentemente da pureza das substâncias que os constituem. Estes podem apresentar-se como polimorfos, solvatos (hidratados), sais, co-cristais e sólidos amorfos. Cada um apresenta as suas próprias características, como propriedades térmicas, mecânicas, físicas e químicas bem definidas, as quais têm uma influência direta sobre a solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade, higroscopicidade, ponto de fusão, estabilidade e compressibilidade do medicamento (Lu, 2012a; Stoimenovski et al., 2010).

A nível metabólico os IFAs podem desempenhar várias funções importantes, podendo atuar como antioxidantes, protegendo as macromoléculas de danos oxidativos, promover o enrolamento proteico, regular o volume celular, modular reações bioquímicas, entre outras. Estes também podem possuir várias propriedades farmacêuticas, tais como ação antimicrobiana, anti-séptica ou anti-incrustante, inibição da acetilcolinesterase,

inibição da AMP desaminase, antinocicepção, anticolinérgica e anticancerígena (Samshina, Barber, & Rogers, 2013).

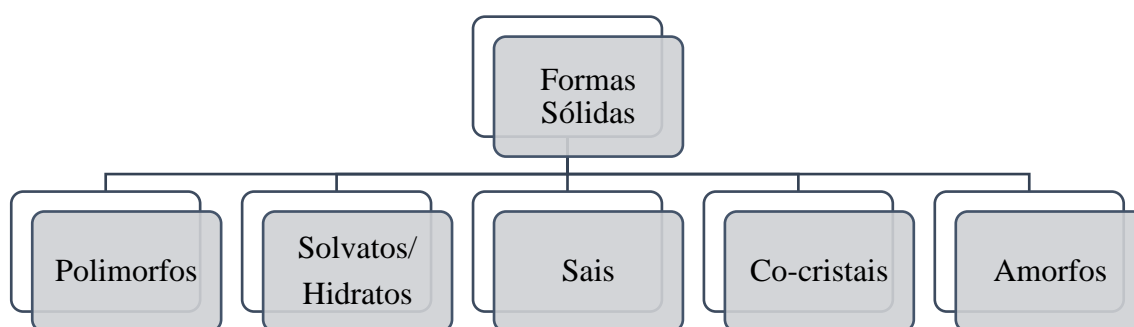


Figura 2 - Esquema representativo das estruturas das formas sólidas dos IFAs [adaptado de Lu, 2012] (Lu, 2012b)

A cristalização é considerada como o último ponto da purificação química na produção de IFAs. Desta forma, verifica-se uma enorme importância em saber qual a composição do sólido e qual o seu processo de cristalização de forma a ser desenvolvido um IFA adequado para o medicamento a produzir (Stoimenovski et al., 2010).

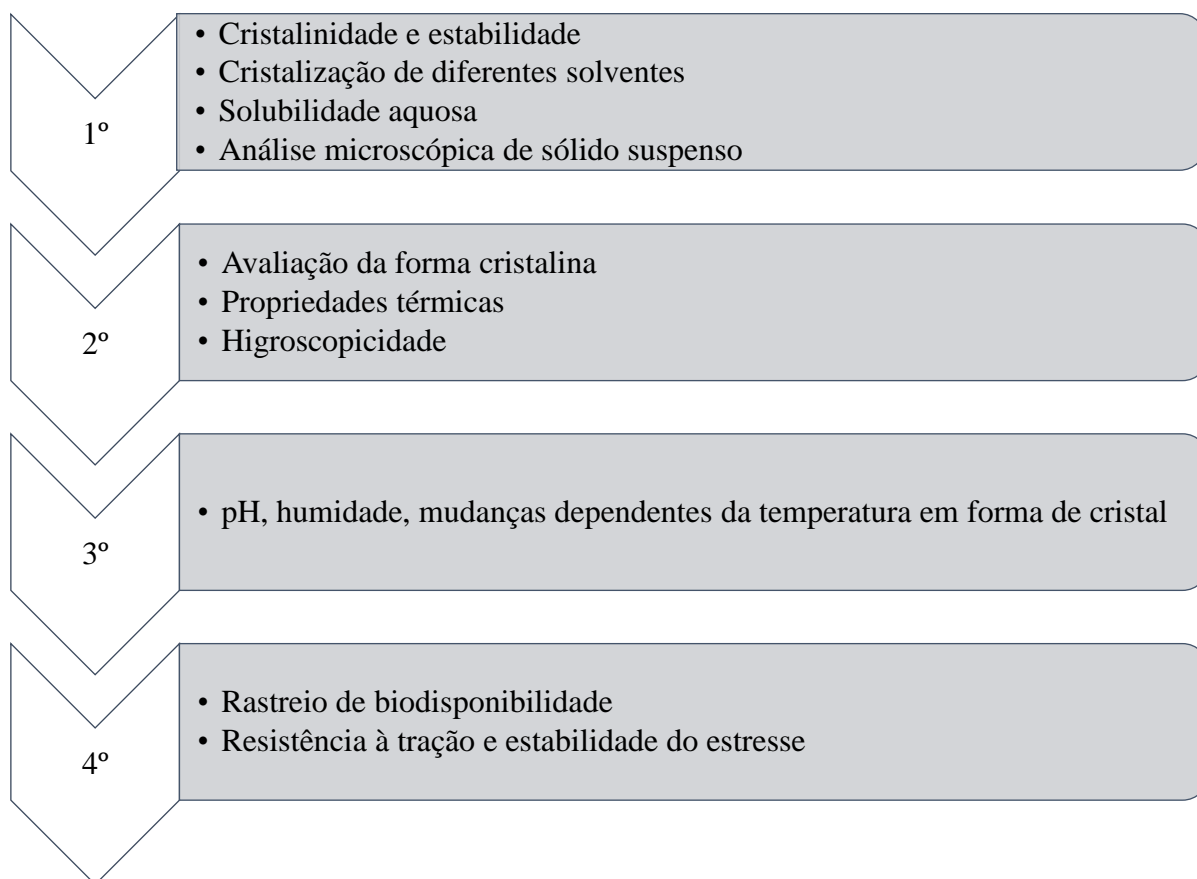


Figura 3 - Abordagem multi-camada para a seleção de sólidos farmacêuticos. [adaptado de Lu, 2012] (Lu, 2012b)

Do ponto de vista farmacológico, é apropriado apostar em IFAs sob a forma sólida, devido à sua pureza, facilidade de manuseamento e fabrico, e ainda devido à sua estabilidade térmica, porém estes apresentam alguns aspetos menos favoráveis devido à possibilidade de formação de polimorfismos, isto é, fármacos com mais do que uma forma cristalina, baixa solubilidade, pouca biodisponibilidade e ainda cristalização espontânea em formas amorfas levando assim à necessidade de se efetuar um rastreamento constante de novas drogas (Marrucho et al., 2014; Stoimenovski et al., 2010).

Desenvolvimentos recentes têm revelado que muitos IFAs conhecidos podem ser facilmente convertidos em líquidos iônicos, melhorando dessa forma algumas características, tais como solubilidade e taxa de dissolução, o que pode ter um impacto direto na farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos. Estes, uma vez que são

farmacologicamente ativos e termodinamicamente estáveis, evitam os problemas relativos com o polimorfismo e "transformação polimórfica" que está associada à forma sólida dos IFAs (Stoimenovski et al., 2010).

O estudo de IFAs na forma de LI é uma das opções viáveis para a indústria farmacêutica, pois além de permitir eliminar alguns inconvenientes como o caso dos polimorfismos, ainda apresenta diversas vantagens potenciais, nomeadamente ao nível das propriedades farmacológicas dos compostos, tais como atividade antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória (Stoimenovski et al., 2010).

Estudos revelam, portanto, que o estado líquido em si não deve ser ignorado ou até mesmo descartado, mas sim considerado como uma alternativa às técnicas comuns associadas à obtenção de IFAs no estado sólido (Stoimenovski et al., 2010).

1.2 Líquidos Iônicos como antibacterianos

Os LIs que apresentam atividade antimicrobiana são por norma não voláteis, não inflamáveis, com baixos pontos de fusão, baixa viscosidade e grande estabilidade térmica. Estas propriedades físicas podem, em teoria pelo menos, facilitar a sua utilização como biocidas de superfície (Carson et al., 2009).

Existem inúmeros métodos para a determinação rigorosa da suscetibilidade microbiana a antimicrobianos/antibióticos. Estes métodos são de extrema relevância, pois fornecem dados vitais quanto à sensibilidade ou tolerância a um determinado biocida ou antibiótico de forma a serem efetuados tratamentos adequados para as diversas infeções microbianas. A maioria destes testes tem-se baseado em ensaios básicos de suscetibilidade planctónica (concentração inibitória mínima (MIC) ou concentração bactericida mínima/concentração fungicida mínima (MBC/MFC), ou técnicas de difusão em agar), porém a importância da avaliação da atividade antimicrobiana contra biofilmes microbianos também tem sido discutida (Carson et al., 2009; Gilmore, 2011).

Neste contexto, tem sido estudado o potencial antimicrobiano de LIs, recorrendo a diferentes combinações de catiões e aniões. Cole et al. abordaram a atividade

antibacteriana de LIs, com o catião baseado em imidazólio ou piridínio e tendo como anião um antibiótico β -lactâmico. Utilizaram o método da medição da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *E. faecium* para quantificar as respectivas propriedades antimicrobianas. Segundo estes, os LIs melhoraram a atividade antibacteriana em comparação com as moléculas de origem (Cole et al., 2011).

De forma semelhante, foram também sintetizados novos LIs baseados na ampicilina como anião e avaliada a sua atividade antimicrobiana. Segundo os estudos efetuados verificou-se a inibição do crescimento e propriedades bactericidas para algumas bactérias sensíveis e resistentes, especialmente, gram-negativas, quando comparadas com a ampicilina sódica e os sais de brometo e cloreto iniciais. Os resultados obtidos, especialmente contra duas estirpes Gram-negativas resistentes, revelam nitidamente um papel promissor de IFA-LIs como drogas antimicrobianas (Ferraz et al., 2014).

1.2.1 Bactérias e antibacterianos

As bactérias são seres unicelulares, isto é, são constituídas por uma única célula, porém podem apresentar diversos tamanhos e formas. Apesar da sua constituição simples, estas classificam-se de acordo com a sua estrutura, que pode variar desde cocos (esféricos) a bacilos (forma cilíndrica). Na sua constituição as bactérias possuem diferentes componentes, cada um com uma função distinta, como ribossomas, citoplasma, nucleóide, flagelos, membrana celular e parede celular que, do ponto de vista de sobrevivência, é particularmente relevante, uma vez que confere forma e proteção à bactéria. A parede celular é composta por peptidoglicano, que é um heteropolissacarídeo composto por dois monómeros, nomeadamente, N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetil-murâmico (NAM), organizados alternadamente e unidos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Do ponto de vista de caracterização biológica, este componente da parede celular tem extrema importância, pois é através deste que é feita a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano que se encontra entre a membrana celular interna e externa; por sua vez, as bactérias Gram-positivas contêm uma camada espessa de peptidoglicano não

possuindo assim membrana externa (Kong, Schneper, & Mathee, 2010; Pereira & Póvoa, 2011); (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010).

O crescimento bacteriano divide-se em quatro fases: fase de latência, em que há uma adaptação da bactéria ao meio, fase logarítmica, em que há um crescimento exponencial, fase estacionária, em que há paragem da divisão celular e conseqüentemente do crescimento bacteriano, e por fim, a fase de declínio em que as bactérias se encontram em processo de morte celular. O estudo do crescimento bacteriano bem como da composição das bactérias é de extrema relevância pois auxilia na seleção do antibacteriano ou bactericida a utilizar (Silhavy et al., 2010); (Kong et al., 2010); (Pereira & Póvoa, 2011).

Os antibacterianos surgiram em 1928 com Alexandre Fleming. Este, numa das suas experiências, observou que na presença de um fungo (*Penicilium notatum*) o crescimento da bactéria em estudo (*Staphylococcus aureus*) era inibida (Kong, Schneper, & Mathee, 2010; Pereira & Póvoa, 2011; Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). Portanto, um antibacteriano é qualquer substância capaz de combater uma infeção causada por microrganismos que causam infeções a outro organismo. Este termo tem sido maioritariamente utilizado quando essas substâncias atingem bactérias (Pereira & Póvoa, 2011); (Kong et al., 2010); (Silhavy et al., 2010).

O antibacteriano pode ser bactericida e bacteriostático, dependendo do seu modo de atuação, isto é, se este causa a morte das bactérias ou se inibe a sua replicação, respetivamente (Pereira & Póvoa, 2011).

1.2.1.1 Escherichia coli (E. coli)

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família das Enterobactereaceas. Esta, por norma, encontra-se na microbiota intestinal como habitante comensal do intestino do ser humano podendo também existir noutros animais (Bertão & Saridakis, 2007).

Esta bactéria produz diversos tipos de toxinas. As enterotoxinas são produzidas por estirpes enterotoxigénicas de *E. coli* e causam a eliminação excessiva de água e iões

levando a uma diarreia líquida. A toxina Shiga é produzida por outra estirpe de *E. coli*, nomeadamente, a enterohemorrágica (EHEC) podendo causar diarreia e ulceração do trato gastrointestinal. Por fim, a toxina enteroagressiva (EAEC) é produzida por uma estirpe agressiva (Bertão & Saridakis, 2007).

A produção de uma ou mais toxinas Shiga, isoladamente, não é suficiente para causar doença, sendo necessário a existência de outros fatores relevantes como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (Bertão & Saridakis, 2007).

A *E. coli* apresenta na sua constituição flagelos, que são estruturas que permitem a locomoção da bactéria, pili e fimbrias que permitem a sua fixação, cápsula para a tornar resistente e proteínas de membrana externa que auxiliam a endocitose (Bertão & Saridakis, 2007). É uma das bactérias mais relevantes em algumas condições patológicas, tais como, intoxicação alimentar, infeções do trato urinário, apendicite, peritonite, colecistite septicémia e meningite neonatal (Bertão & Saridakis, 2007).

1.2.1.2 Staphylococcus aureus (S. aureus)

A *S. aureus* é uma bactéria da família Micrococacea. Esta bactéria faz parte do grupo dos cocos gram-positivos e é normalmente encontrada nas fossas nasais e na pele de pessoas saudáveis, porém pode causar patologias que poderão apresentar diferentes gravidades, tais como, acne e furúnculos, meningite, septicemia entre outras (Santos et al., 2007).

Geralmente estas bactérias não apresentam cápsula nem esporos, contudo podem variar a sua forma desde células esféricas isoladas, cocos aos pares ou até agrupados (cacho de uva) (Santos et al., 2007).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, pois é uma bactéria que consegue resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira (Santos et al., 2007). A resistência da *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações nos seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou de outras espécies). Geralmente, a resistência que

ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transposões (Santos et al., 2007).

A capacidade de colonização e a patogenicidade da *S. aureus* são, portanto, uma consequência de seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão à resposta imunológica do hospedeiro (Santos et al., 2007).

1.3 Leveduras – *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares encontrados em diversos locais, como ar, solo, plantas, frutos e alimentos. A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais comum de levedura, sendo conhecida como levedura de padeiro ou da cerveja. Tem um papel fundamental na produção de bebidas alcoólicas através da fermentação alcoólica, na qual produz o etanol, e também na produção de pão em que o dióxido de carbono permite o crescimento deste. Porém, a sua presença nem sempre é benéfica para o seu humano, uma vez que são um dos elementos responsáveis pela deterioração dos frutos e de outros alimentos (Lee, Park, Wohlgemuth, & Fiehn, 2013); (Branco et al., 2016).

São células de fácil cultivo e manipulação em laboratório que apresentam um sistema genético simples e de fácil manipulação, o que as torna um modelo celular extremamente útil para o estudo de diferentes processos e respostas celulares. Nesse contexto, apresentam grande relevância em diversas áreas, como, por exemplo, na investigação laboratorial, na indústria, entre outras. Em particular, a *S. cerevisiae* tem sido muito útil no estudo de várias doenças como, por exemplo, a diabetes tipo II, bem como em diversas análises genéticas e na elucidação dos processos subjacentes às transformações neoplásicas (Voordeckers & Verstrepen, 2015); (Fan, Li, & Chen, 2014; Grunsteins & Gasser, 2013).

1.4 Resistência aos antibacterianos

O uso excessivo de antibióticos e o desenvolvimento da resistência aos mesmos é, atualmente um grande problema para a saúde pública. O aumento da resistência aos antibióticos implica um aumento substancial da morbidade e da mortalidade. Estima-se que, anualmente, a resistência aos antibióticos cause cerca de 50 000 mortes na Europa e nos EUA e que não sendo controlada levará a um aumento da mortalidade para cerca de 10 milhões de pessoas até 2050 (Ronnerstrand & Sundell, 2015).

Há um crescente reconhecimento de que limitar a resistência aos antibióticos está longe de ser apenas uma preocupação médica, mas sim um problema comportamental e social. Uma vez que o consumo de antibióticos é o principal motor do desenvolvimento da resistência aos mesmos, é urgente a necessidade de mudanças comportamentais em larga escala em relação a esse consumo (Ronnerstrand & Sundell, 2015).

As doses clínicas de antibióticos administradas conferem uma vantagem seletiva para bactérias resistentes naturalmente emergentes, levando à ineficácia da droga uma vez que a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos têm vindo a estagnar. Portanto, é de extrema relevância o desenvolvimento de novas formulações, de forma a suprimir o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos com o repertório de antibióticos disponível ou juntamente com outros substratos químicos (Suzuki, Horinouchi, & Furusawa, 2015).

Os avanços recentes nas diversas pesquisas efetuadas permitem identificar mudanças fenotípicas e genotípicas por parte das bactérias que contribuem para a aquisição de resistência a antibióticos. Por exemplo, o sequenciamento do genoma de bactérias resistentes aos antibióticos levou à identificação de uma série de mutações comuns que contribuem para a sua resistência. Esses dados contribuíram para a identificação de mecanismos moleculares de resistência e auxiliaram na concepção de métodos para controlar o surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos (Suzuki et al., 2015).

Existem vários alvos possíveis para antibióticos. De um modo geral, podemos agrupar os mecanismos de ação dos antibióticos em cinco categorias, nomeadamente:

inibição da síntese da parede celular, comprometimento da membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese proteica e ação antagonista metabólica. Em geral, existem quatro mecanismos básicos pelos quais a resistência ao fármaco pode ocorrer em bactérias: alteração do alvo antimicrobiano que pode ser devido à perda completa de afinidade ou diminuição simples, diminuição na quantidade de antimicrobiano que atinge o alvo por redução de entrada causada por uma menor permeabilidade devido a mutação porinosa ou por um aumento de saída causado pelo bombeamento por um transportador de efluxo, presença de um mecanismo enzimático que destrói total ou parcialmente as moléculas antimicrobianas e o desenvolvimento de uma via metabólica alternativa envolvendo precursores (Fernandes, Amador, & Prudêncio, 2013).

A evolução das bactérias para a resistência a medicamentos antimicrobianos, incluindo a resistência a múltiplos medicamentos, é inevitável pois estas encontram-se em constante evolução tornando-se cada vez mais complexas. Portanto, o único meio de lidar com essa situação é atrasar o surgimento e posterior disseminação das mesmas ou de genes de resistência. A resistência aos medicamentos antimicrobianos nas bactérias pode resultar de mutações nos genes estruturais ou reguladores. Porém, as resistências podem ainda resultar da aquisição horizontal de informações genéticas estranhas à bactéria em questão. Ambas as formas, podem ser associadas ao surgimento e à disseminação de resistência mais eficiente (Courvalin, 2005).

A disseminação da resistência antimicrobiana pode ocorrer ao nível das bactérias (disseminação clonal), de replicões (epidemia de plasmídeos), ou de genes (transposões). Estes 3 níveis de disseminação, que coexistem na natureza, não são apenas infecciosos, mas também exponenciais, uma vez que todos estão associados à duplicação de DNA. A disseminação clonal está associada à replicação cromossômica, conjugação de plasmídeos com transferência replicativa e migração de genes com transposição replicativa (Courvalin, 2005).

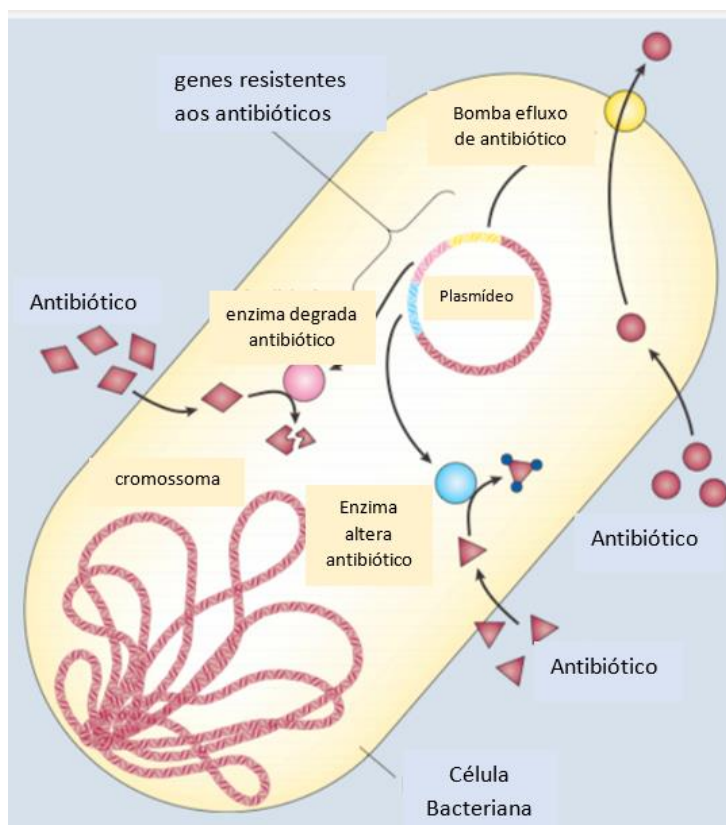


Figura 4 - Processo de Resistência aos antibióticos (adaptado de (Marshall & Levy, 2004))

Em suma, são necessários mais estudos sobre as complexas interações fenotípicas e genotípicas da resistência aos antibióticos que auxiliem o desenho racional de estratégias para controlar o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, salientando análises de alto rendimento, como o re-sequenciamento do genoma, do transcriptoma e subsequente análise metabólica (Suzuki et al., 2015).

Por último, é importante salientar que, de uma forma geral, o organismo humano consegue gerir grande parte das infecções, contudo a incorreta administração de antimicrobianos leva a que estes sejam menos eficientes ou até que não desempenhem de todo a função para a qual são utilizados. Assim, é relevante utilizar os mesmos apenas quando necessários e num período de tempo adequado. Desta forma, verifica-se mais uma vez a relevância que constituem os avanços na investigação sobre LIs, pois, devido à sua capacidade de combinação de diferentes constituintes, e de adaptação à patologia em estudo, pode contribuir para uma diminuição das resistências antibacterianas, e desta forma potenciar o surgimento de um novo medicamento (Courvalin, 2005; Montagner, Jacinto, Signoretti, & Gomes, 2014; Suzuki et al., 2015).

1.5 Antibacterianos

Os antibióticos podem ser naturais ou sintéticos e têm a capacidade de inibir o crescimento ou mesmo eliminar fungos e bactérias. Quando causam a morte são designados por bactericidas, porém quando inibem o crescimento bacteriano são chamados bacteriostáticos (Pereira & Póvoa, 2011).

Os antibióticos abordados são os beta-lactâmicos e as fluoroquinolonas.

1.5.1 Beta lactâmicos

Os beta-lactâmicos são uma classe de antibióticos de elevada importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Este grupo define-se pela presença de um anel beta-lactâmico, que é composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio podendo ainda conter diversos radicais substituintes que o tornam ativo (Figura 5). O anel beta-lactâmico é determinante no mecanismo de resistência das bactérias às beta-lactamases e determina não só o mecanismo de ação, nomeadamente a inibição da síntese do peptidoglicano como a sua baixa toxicidade (atuam na parede celular e esta não está presente nas células eucariotas) (Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010).

Esta família de antibióticos é bastante heterogênea, pois, apesar de todos conterem o anel beta-lactâmico na sua estrutura, podem ainda apresentar na sua composição outras características que modificam o seu espectro de ação e formas de resistência bacteriana (Guimarães et al., 2010).

Existem quatro famílias de beta-lactâmicos: os carbopenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactams (Guimarães et al., 2010).

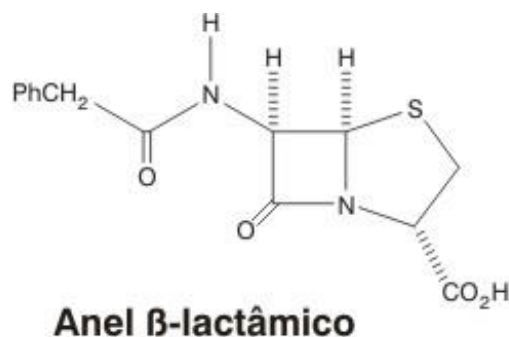


Figura 5 - Exemplo de antibiótico Beta-lactâmico, penicilina, onde se consegue ver o anel beta-lactâmico.

1.5.2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são um grupo de antibióticos bastante conhecido no tratamento de várias infecções bacterianas. Estas são derivadas do ácido nalidixico e apresentam na sua composição um átomo de flúor que é o que as diferencia das quinolonas (Figura 6) (Hooper, 2001).

Este grupo de antibióticos é considerado bastante tóxico, de forma que ao longo do tempo foram desenvolvidas novas drogas desta classe com um espectro de ação mais amplo e melhor cobertura para gram-positivas, porém devido à sua elevada toxicidade muitas acabaram por ser eliminadas do mercado (Hooper, 2001).

As fluoroquinolonas em uso são: ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina e delafloxacina (Hooper, 2001).

Estas são relevantes em infecções do trato urinário mas também tem ganho relevância ao nível do trato respiratório (Hooper, 2001).

A seu mecanismo de ação parece ocorrer por interação da droga com o DNA em que há o envolvimento de duas enzimas, a DNA girase (gram negativas) e topoisomerase IV (gram positivas) (Hooper, 2001).

As DNA-topoisomerasas mudam o número de ligações no DNA superenrolado através de quebras transitórias no mesmo. As topoisomerasas são essenciais para a viabilidade celular em células procarióticas e eucarióticas. As quinolonas apresentam boa seletividade para células bacterianas (Hooper, 2001).

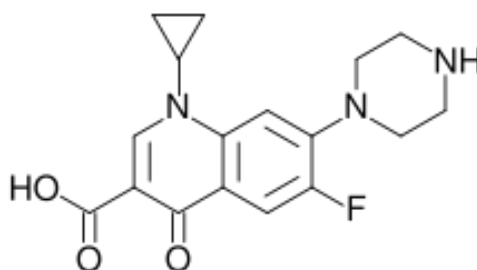


Figura 6 - Exemplo de Fluoroquinolona - ciprofloxacina

1.6 Líquidos Iônicos como agentes antitumorais

É de conhecimento geral que o cancro tem um impacto significativo na saúde mundial, e que requer terapias inovadoras de forma a minimizar ou eliminar os efeitos colaterais associados às terapias convencionais. Neste contexto, apenas cerca de 10% das drogas avaliadas em ensaios clínicos são lançadas no mercado, que é uma taxa de sucesso muito baixa. Portanto, há urgência em encontrar novos avanços científicos para gerar drogas e terapias eficazes, uma vez que o cancro é uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O desenvolvimento de novos agentes antitumorais com menor toxicidade e que podem evadir os mecanismos de resistência tumoral é um dos principais objetivos no campo da pesquisa farmacêutica na área da oncologia (Dias, Rodrigues, Fernandes, Ferraz, & Prudêncio, 2017); (Ferraz et al., 2012; Ferraz et al., 2011).

Assim, os LIs são vistos como possíveis compostos utilizáveis no desenvolvimento de novos agentes antitumorais, pois apresentam a capacidade de se ajustar e afinar a sua toxicidade ao adaptar as suas propriedades físico-químicas e farmacológicas para a aplicação da terapêutica desejada. O surgimento dos LIs de terceira geração veio eliminar os problemas relacionados com os polimorfismos referentes às formas sólidas e trazer um novo caminho para avanços medicinais e oncológicos (Dias et al., 2017); (Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2016; Ricardo Ferraz et al., 2015).

Diversos estudos foram efetuados no sentido de verificar a potencial atividade antitumoral das LIs, analisando a sua toxicidade em relação a linhas celulares humanas de cancro e comparando-as com linhas celulares humanas saudáveis. A tabela que se segue revela alguns dos estudos efetuados indicando a importância dos LIs como agente antitumoral e a sua ação nas diferentes linhas celulares.

Tabela 1 - Estudos da atividade anti-tumoral de LIs em diferentes linhas celulares [adaptado de Dias, A 2017]

1º autor	Linha celular	Tipo de cancro	Ensaio experimental	Líquido iónico	Ano de Publicação
R. F. M. Frade	HT-29 CaCo-2	Carcinoma do intestino	MTT ^(a)	Catiões à base de imidazólio com várias cadeias laterais: colina, 1-butil-2,3-dimetilimidazólio, tetrahexildimetil guanidínio, trihexiltetradecilfosfónio e trioctilmetilamónio combinados com diferentes aniões: BF ₄ , PF ₆ , dicianoamida, acesulfame, sacarina e Tf ₂ N	2007
X. Wang	HeLa	Cancro cervical	MTT	1-alkuil-3-metilimidazolio substituído com etilo, butilo, octil-, benzilo e alil-substituído, Alquilpiridinio, N-alkuil-N, N-dimetil-N- (2-hidroxietil) amónio (derivados de colina) e sais de alquiltrietilamónio	2007
R. A. Kumar	MCF-7	Cancro da mama	MTT	Cianetos de piridínio, piperidínio, pirrolidínio ou imidazólio com vários comprimentos de cadeia de alquilo e aniões: brometo, Tf ₂ N, TfO, NfO Três novos IIs hidrofóbicos específicos: 1- (3-cianopropil) -1-metilpiperidínio [(CF ₃ SO ₂) ₂ N],	2009

				1-metil-1- [4,5-bis (metiltio) pentil] piperidínio [(CF ₃ SO ₂) ₂ N] e 1-metil-1- [4,5-bis (metiltio) pentil] pirrolidínio [(CF ₃ SO ₂) ₂ N]	
V. Kumar	NCI60 ^[b]	Leucemia, NSCLC, cancro SNC, melanoma, cancro da mama, ovário, renal e da próstata	MTT	Sete ILs baseados em fosfónio e amónia	2009
R. F. M. Frade	CaCo-2	Cancro do intestino	MTT	80 ILs de diferentes classes de catiões e aniões com base em imidazólio, guanidínio, amónio, fosfónio, piridínio e pirrolidínio	2009
S. V. Malhotra	NCI60 ^[b]	Leucemia, NSCLC, cancro SNC, melanoma, cancro da mama, ovário, renal e da próstata	MTT	ILs com base em imidazolio com comprimento variável da cadeia lateral ou cadeias laterais funcionalizadas e diferentes aniões: [(CF ₃ SO ₂) ₂ N], BF ₄ , PF ₆ , trifluorotris (1,1,2,2,2-pentafluoroetil) fosfato, octil sulfato e cloreto	2010
N. K. Kaushik	T98G HEK	Cancro do cérebro, cancro do rim embrionário humano	MTT	Quatro ILs de amónio e imidazólio	2012
C. Suresh	A375 SH-SY5Y	Melanoma, neuroblastoma,	MTT	ILs baseados em ácido betulínico com catiões como colina e benzalcónio	2012

	MCF-7 A431	adenocarcinoma da mama, carcinoma epidermoide			
C. Jing	QGY-7701	Hepatocarcinoma	WST-1 ^(d)	Cloreto de 1-metil-3-octimidazólio	2013
R. Ferraz	T47D PC3 RKO HepG2 MG63	Cancro da mama, próstata, intestino, carcinoma hepatocelular, osteosarcoma	MTT	Sais de ampicilina como ILs com base em catiões tetraetilamónio, trihexiltetradecilfosfónio, cetilpiridínio, colina, 1-etil-3-metilimidazolio e 1-hidroxietil-3- metilimidazólio	2015
X. Li	HepG2	hepatocarcinoma	WST-1 ^(e)	1-metil-3-octimidazolium bromide	2015
[a] brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio. [b] US National Cancer Institute 60-tumor-célula-linha painel. [c] Carcinoma de pulmão de células não pequenas. [d] 2- (4-Iodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) -2H-tetrazólio. [e] 2- (2-Metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2H-tetrazólio.					

Portanto, é possível concluir que, dependendo da composição/estrutura dos LIs, a sua toxicidade vai afetar de forma diferencial os diferentes tipos celulares em que vai atuar.

1.7 Processo de formação e desenvolvimento neoplásico

Ao longo do tempo têm sido efetuadas inúmeras pesquisas de forma a tentar esclarecer o processo de formação de neoplasias ou tumores. As neoplasias consistem em aglomerados celulares que resultam da divisão de uma célula progenitora. Estas são divididas em dois grupos, consoante o seu potencial de invasibilidade e metastização. Nesse sentido, existem as neoplasias benignas (localizadas) e as neoplasias malignas, também designadas por cancro. Estas últimas apresentam pior prognóstico devido à sua capacidade de invadir e colonizar tecidos adjacentes (Hanahan & Weinberg, 2011); (Lupia & Cavallaro, 2017).

O processo de formação neoplásica é lento, podendo levar anos até que uma célula normal evolua para uma célula neoplásica. Trata-se de um processo composto por várias etapas durante o qual as células sofrem alterações metabólicas e comportamentais, levando-as a proliferar de forma excessiva e a escapar à vigilância do sistema imunológico, acabando assim por invadir tecidos distantes e formar metástases. Essas mudanças surgem através da acumulação de modificações nos genes que controlam a proliferação celular, a sobrevivência celular, as relações com as células vizinhas e a capacidade de escapar do sistema imunológico (Hanahan & Weinberg, 2011; Liao & Yang, 2017; Lupia & Cavallaro, 2017).

Este processo resulta na formação de uma massa de células desreguladas, uma vez que, estas não obedecem às regras que controlam o seu crescimento e comportamento normal. Essa condição pode ser assintomática por um longo período de tempo. Porém, acabará por prejudicar as funções fisiológicas, dando origem a múltiplas consequências clínicas (Hanahan & Weinberg, 2011); (Liao & Yang, 2017).

A formação neoplásica tem por base quatro estádios diferentes, nomeadamente, iniciação, promoção, progressão e metástase. A iniciação envolve a alteração, mudança

ou mutação de genes que surgem espontaneamente ou induzidos pela exposição a um agente cancerígeno. As alterações genéticas podem resultar em desregulação de vias de sinalização intracelulares associadas à proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, que podem ser influenciados por vários fatores, incluindo a taxa e o tipo de metabolismo cancerígeno e a resposta da função de reparação do DNA. A fase de promoção é considerada um processo relativamente longo e reversível no qual as células pré-neoplásicas que proliferam se acumulam. Contudo, no decorrer deste processo as células podem ser alteradas por agentes quimiopreventivos afetando assim o seu desenvolvimento e crescimento. A progressão é a fase que culmina no desenvolvimento de cancro com potencial invasivo. A progressão é o ponto final da transformação neoplásica, onde ocorrem mudanças genéticas e fenotípicas e proliferação celular. Isto envolve um aumento rápido no tamanho do tumor, onde as células podem sofrer novas modificações com potencial invasivo e metastático. Os agentes quimiopreventivos devem poder atuar preferencialmente nos processos de iniciação e promoção da carcinogênese. A metástase envolve a disseminação de células cancerígenas do local primário para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou do sistema linfático. Sabe-se que os agentes quimiopreventivos inibem a angiogênese (formação de novos vasos) e a invasão de tumores primários e, portanto, podem ser utilizados para inibir a metastatização (Schreiber, Old, & Smyth, 2011); (Liao & Yang, 2017; Lupia & Cavallaro, 2017).

Atualmente, reconhece-se que o sistema imunológico desempenha pelo menos três papéis distintos na prevenção do cancro: protege o hospedeiro contra infecções virais e, portanto, suprime os tumores induzidos por vírus; impede o estabelecimento de um ambiente inflamatório que facilite a formação do tumor pela eliminação de agentes patogênicos e pela rápida resolução da inflamação; e elimina as células tumorais em certos tecidos. Porém, para além de prevenir o surgimento do cancro, este também pode, em alguns casos, promover a sua progressão, quer selecionando células tumorais mais aptas para sobreviver num hospedeiro imunocompetente, quer estabelecendo condições dentro do microambiente tumoral que facilitam a proliferação do mesmo (Schreiber et al., 2011; Zhang & Xu, 2017).



Figura 7 - Processo da evolução tumoral.

Em condições normais, os tecidos controlam cuidadosamente a produção e a libertação de sinais que promovem o crescimento e regulam o ciclo celular, garantindo assim uma homeostasia do número de células e, portanto, a manutenção da arquitetura e função normal dos tecidos. No entanto, as células neoplásicas têm a capacidade de sustentar a sua proliferação. Estas desregulam os pontos de controlo do ciclo celular e tornam-se responsáveis pelo seu próprio destino. Os sinais de aptidão destas células são transmitidos em grande parte por fatores de crescimento que se ligam aos recetores da superfície celular e procedem à emissão de sinais através de vias de sinalização intracelulares complexas que, por sua vez, regulam a sua progressão através do ciclo celular, bem como o seu crescimento. Muitas vezes esses sinais influenciam ainda outras propriedades biológicas celulares, como a sobrevivência celular e o metabolismo energético (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015).

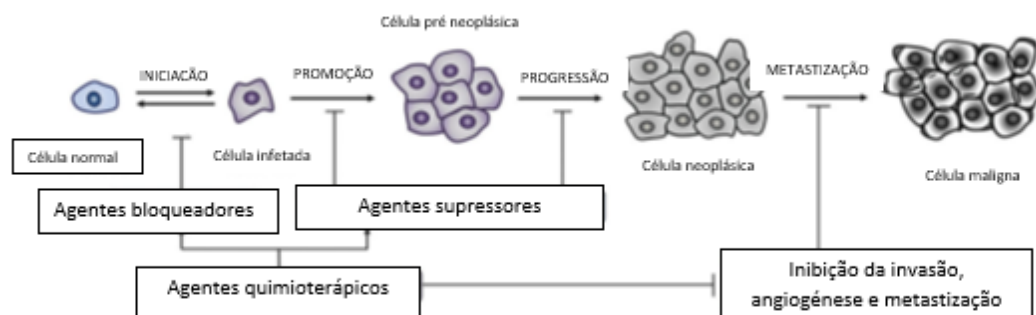


Figura 8 - Formação do cancro (adaptado de (Siddiqui et al., 2015))

1.7.1 Vias de sinalização

As vias de sinalização são geralmente constituídas por proteínas cuja função primordial se foca na regulação dos eventos ao nível da fisiologia celular, como é o caso da proliferação, migração e diferenciação celular. Porém, a maioria das proteínas que participam neste mecanismo de sinalização são enzimas, biocatalizadores que aumentam a velocidade das reações que ocorrem no interior das células. De entre elas, encontram-se as quinases, por exemplo, que são enzimas que catalisam reações de fosforilação e que participam em diversas vias de sinalização (Ghosh & Dass, 2016; Rauch, Rukhlenko, Kolch, & Kholodenko, 2016).

Todas as vias de sinalização têm um objetivo comum, produzir uma resposta celular a partir de um estímulo, normalmente intracelular, sendo possível o envolvimento de mais do que uma via de sinalização neste processo. A desregulação das vias de sinalização celular, causada geralmente por aumento/diminuição da atividade ou expressão de seus constituintes proteicos, pode levar ao descontrolo de eventos fisiológicos e desencadear variados tipos de doenças, incluindo o cancro (McCubrey et al., 2006).

MEK

A via de sinalização MEK envolve a atuação de um grupo de proteínas com três isoformas, nomeadamente, MEK1, MEK1b e MEK2. Estas são constituídas por um domínio quinase catalítico que é rodeado por um domínio N-terminal regulatório (80 aminoácidos) e uma região C-terminal mais curta (30 aminoácidos). As proteínas em questão coordenam os efeitos intracelulares, através da regulação da expressão de vários genes e, conseqüentemente, da proliferação celular (Grimaldi et al., 2017; Shaul & Seger, 2006).

A via MEK é fundamental para a formação e desenvolvimento neoplásico. Neste contexto, atualmente tem havido um interesse crescente por inibidores desta via de sinalização, nomeadamente em estudos pré-clínicos e laboratoriais que apoiam a via MAPK como um alvo viável para a terapia de alguns tipos de cancro (Grimaldi et al., 2017; Shaul & Seger, 2006).

NFKB

NFκB é conhecido como um fator de transcrição necessário para o funcionamento de quase todas as células num organismo vivo. Este desempenha uma função bem conhecida na regulação das respostas imune e inflamatória, porém evidências crescentes indicam ter também um papel relevante na oncogénese. O NFκB regula a expressão de genes envolvidos em muitos processos que aparentam ser fundamentais para o desenvolvimento e progressão do cancro, como é o caso da proliferação, migração e apoptose (Dolcet, Llobet, Pallares, & Matias-Guiu, 2005; Ghosh & Dass, 2016).

De facto, a ativação anormal ou constitutiva de NF-κB foi detetada em diversas neoplasias malignas humanas. Nos últimos anos, estão a ser efetuados numerosos estudos de forma a elucidar as conseqüências funcionais da sua ativação, bem como dos seus mecanismos de sinalização (Dolcet et al., 2005; Ghosh & Dass, 2016).

JNK

A quinase N-terminal de c-Jun (JNK) é uma proteína quinase ativada pelo stress e por fatores ambientais como, por exemplo, a radiação UV. É um regulador de genes pró-inflamatórios, de remodelação tecidual e da apoptose sendo, portanto, um alvo

atraente para novas terapias em diferentes contextos patológicos. A via de sinalização JNK foi caracterizada pela primeira vez como uma proteína quinase ativada pelo stress no início da década de 1990. Apesar do seu potencial como alvo de drogas ter emergido rapidamente, a utilidade dos inibidores de JNK tem merecido uma atenção constante e crescente. Uma das potenciais aplicações deste tipo de inibidores é o tratamento de neoplasias (Bennett, 2006; Zhao, Wang, & To, 2015).

1.8 Planeamento e Objetivos da Tese

Este trabalho tem como objetivo:

1. Estudo da atividade bacteriana de líquidos iônicos baseados em beta-lactâmicos e fluoroquinolonas.

Nesta parte do trabalho pretende-se determinar se LIs baseados em fluoroquinolonas e beta-lactâmicos terão atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, resistentes e sensíveis.

2. Estudo da atividade dos líquidos iônicos baseados em beta-lactâmicos e quinolonas em leveduras.

Nesta parte do trabalho pretende-se determinar se LIs baseados em fluoroquinolonas e beta-lactâmicos terão atividade em leveduras, nomeadamente na *S.cerevisiae*.

3. Estudo da viabilidade/proliferação de determinados líquidos iônicos nas linhas celulares RKO (neoplasia do cólon), T47D (neoplasia da mama), MG63 (neoplasia do osso), A459 (neoplasia do pulmão), Hep62 (neoplasia do fígado).
4. Compreender o modo de atuação das vias de sinalização nos líquidos iônicos em estudo e nas linhas celulares RKO (neoplasia do cólon), T47D (neoplasia da mama), MG63 (neoplasia do osso), A459 (neoplasia do pulmão), Hep62 (neoplasia do fígado).

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em
Fluoroquinolonas

CAPÍTULO II

Material e Método

2. Material e Métodos

Todos os reagentes químicos usados no decorrer do trabalho laboratorial foram obtidos comercialmente, com exceção dos LIs analisados.

2.1 Líquidos Iônicos

Os LIs baseados em antibióticos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas, indicados na figura 3, foram produzidos e purificados pelo grupo do Luís C. Branco no Departamento de Química, Requite – Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

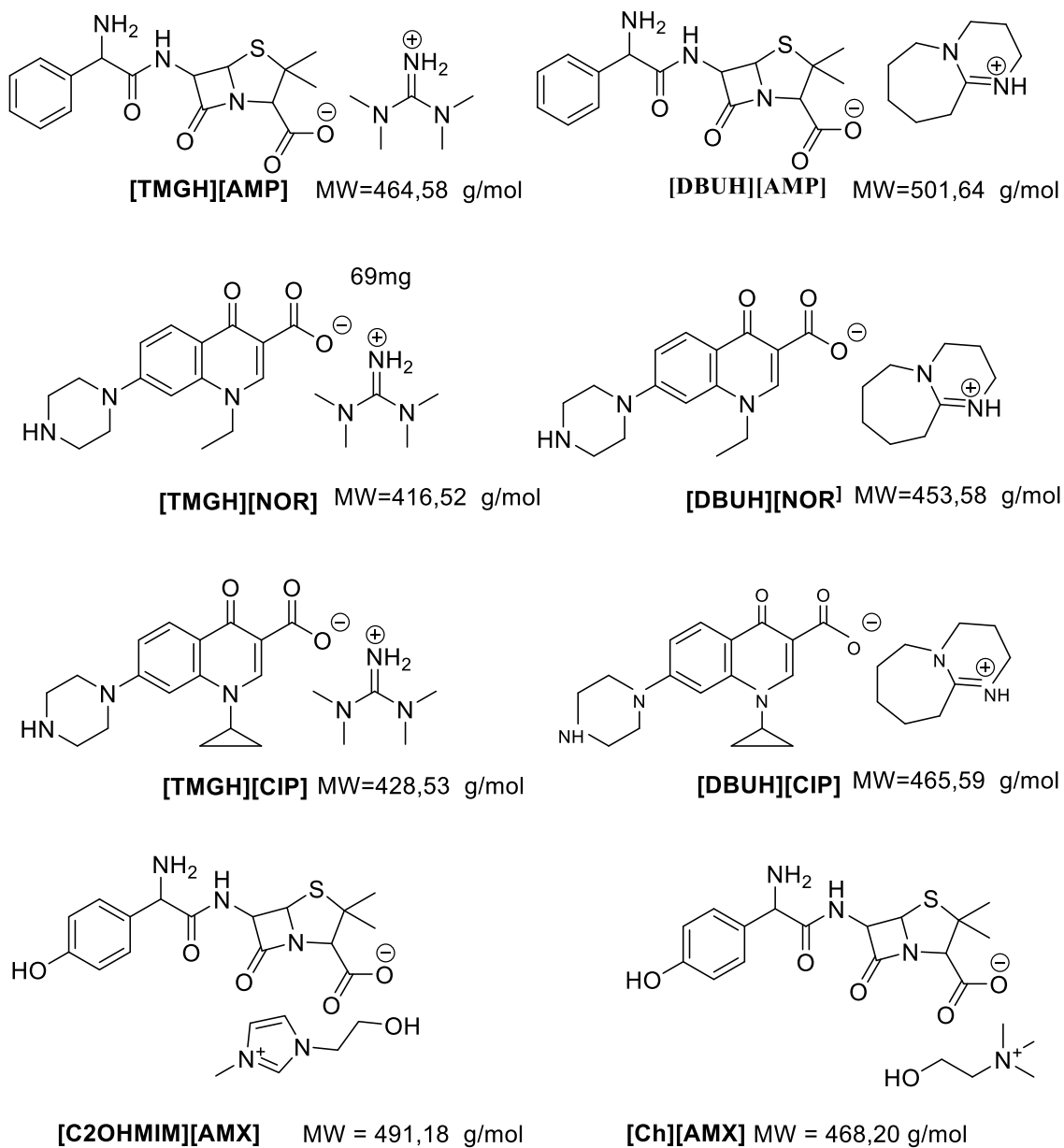


Figura 9 - Compostos em estudo no presente trabalho.

2.2 Estudo em bactérias e leveduras

As bactérias foram cultivadas e mantidas em meio Tryptic Soy Agar (TSA - VWR®). Posteriormente, foram incubadas em ambiente aeróbio durante 24 horas a uma temperatura de 37° C, antes de cada teste (Estufa Binder®).

Sempre que necessário, o crescimento das bactérias foi feito em Tryptic Soy Broth (TSB - VWR®) a 37° C em estufas Incubating Orbital Shaker VWR®. As culturas foram sempre repicadas, de forma a garantir que, em todos os ensaios, as bactérias fossem provenientes de culturas frescas. De salientar que a manipulação das culturas foi sempre realizada sob a metodologia da técnica asséptica (Russel & Hugo, 1998).

No que respeita às leveduras, estas foram cultivadas em meio YEPD e incubadas a 37°C em estufas Incubating Orbital Shaker VWR®. As culturas das mesmas foram sempre repicadas, de forma a garantir que, em todos os ensaios, as leveduras fossem originárias de culturas frescas. A manipulação das culturas foi sempre realizada recorrendo à técnica asséptica.

2.2.1 Preparação das Soluções

Inicialmente, foram preparadas soluções de 50 mM de cada um dos compostos em estudo. Devido às suas características químicas nem todos os LI foram solúveis em água, assim sendo utilizou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente de alguns dos compostos, tal como descrito na tabela IV. Após esterilização da solução pelo filtro de seringa de porosidade 0,2µm - VWR® e recorrendo-se sempre à técnica asséptica, prepararam-se concentrações consecutivamente 10x mais diluídas tal como representado pela tabela V. As concentrações finais foram 50 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. Por fim, as soluções foram armazenadas no frigorífico a -20°C, sendo, posteriormente descongeladas à temperatura ambiente quando necessárias.

2.2.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os valores de MIC foram determinados em triplicado, pelo método de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços, de acordo com a metodologia do CLSI (*NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*) (Seter, Thomson, Chong, MacFarlane, & Forsyth,

2013). Segundo a bibliografia os MIC serão mais baixo pela técnica de diluição em tubo do que pela técnica de difusão em ágar (Cole et al., 2011; Ledeti et al., 2015).

Com o objetivo de obter uma suspensão bacteriana de densidade igual à da solução padrão McFarland 0,5, foram selecionadas colônias de bactérias através da repicagem das culturas frescas. As colônias selecionadas foram transferidas para tubos de ensaio que continham meio de cultura TSB. O ajuste da densidade foi obtido por espectrofotometria, sendo que a absorvância para uma solução padrão McFarland 0,5, se encontrou entre 0,08 e 0,10, a um comprimento de onda de 625 nm (Seter, Thomson, Chong, MacFarlane, & Forsyth, 2013).

As suspensões resultantes apresentaram valores entre 1×10^8 a 2×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) ml^{-1} . Aproximadamente 5000 a 25 000 UFC de bactérias foram expostas ao composto (Nowakonsky et al., 2013).

Prepararam-se cinco soluções stock com concentrações diferentes, 50 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. Destas cinco soluções stock os microrganismos seriam expostos a soluções 100 vezes mais diluídas. Quando necessário foram testados em concentrações superiores. Para além das concentrações já referidas, foram ainda incluídos, um controlo positivo (suspensão bacteriana e TSB) e um branco (apenas TSB).

O volume final em cada poço foi de 200 μl . Em todos os ensaios, o volume de suspensão bacteriana (2 μl) e de composto (2 μl), variando apenas o volume de meio adicionado em cada poço.

O MIC foi determinado como sendo a menor concentração que não apresentou turbidez após incubação (24h a 37°C) (Seter et al., 2013). A presença de turbidez deu a indicação de crescimento microbiano e a correspondente concentração de agente antibacteriano será considerada ineficaz.

2.3 Estudos em linhas celulares

A atividade anti-tumoral dos LIs sintetizados foi avaliada nas linhas celulares tumorais RKO (neoplasia do cólon), T47D (neoplasia da mama), MG63 (neoplasia do osso), A459 (neoplasia do pulmão), Hep62 (neoplasia do fígado).

Culturas de fibroblastos gengivais humanos foram utilizadas como controlo.

A linhas celulares tumorais em estudo foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). As condições de cultura e todos os procedimentos referentes a esta seguiram os métodos descritos por Costa et al. (Costa et al., 2014).

2.3.1 Culturas celulares

Os fibroblastos de gengiva foram obtidos a partir de explantes provenientes de doadores saudáveis, após consentimento informado. As linhas celulares tumorais foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). As condições de cultura e todos os procedimentos referentes a esta seguiram os métodos descritos por Costa et al. (Costa et al., 2014)

As células foram cultivadas em meio α -MEM (*α -modified Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 IU/mL de penicilina, 2,5 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de anfotericina B e 50 μ g/mL de ácido ascórbico. As culturas celulares foram incubadas a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado foi renovado duas vezes por semana. Quando se atingiu uma confluência celular de cerca de 70-80%, as células aderentes foram destacadas enzimaticamente com uma solução de 0,05% tripsina e 0,5mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Posteriormente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, a uma densidade de 10⁴ células/cm².

No dia seguinte, o meio de cultura foi renovado e suplementado com diferentes concentrações dos diferentes LIs (10⁻⁵-10⁻¹M), e as células foram mantidas durante 3 dias nas mesmas condições descritas anteriormente. Quando indicado, as culturas celulares foram suplementadas simultaneamente com os Lis e com diferentes inibidores de vias de sinalização (Tabela 2).

Tabela 2 - Vias de sinalização em estudo, inibidor e concentração utilizada.

Via de sinalização	Inibidor	Concentração
MEK	U0126	1 μ M
NF κ B	PDTC	10 μ M
JNK	SP600125	10 μ M

O comportamento celular foi caracterizado aos dias 0, 1 e 3 através da quantificação da viabilidade/proliferação celular.

2.3.2 Quantificação da viabilidade/proliferação celular

Para avaliar a viabilidade/proliferação celular recorreu-se ao ensaio colorimétrico MTT. O ensaio em questão tem por base a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) num produto roxo, o formazano. Esta reação ocorre no interior das mitocôndrias de células viáveis. Para tal, as culturas foram incubadas a 37°C com 0,5 mg/mL de MTT durante 3h. Após a incubação, o meio de cultura foi removido. Posteriormente, foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO), de forma a promover a dissolução o produto roxo formado, e foi efetuada a leitura da absorvância no leitor de placas de ELISA a 550 nm (Synergy HT, Biotek).

2.3.3 Determinação dos valores de IC50

Os valores da concentração mínima inibitória (IC50) foram obtidos pela análise da regressão não linear das curvas de concentração-efeito. O valor de IC50 é a resposta correspondente a 50% do controlo, sendo utilizada para medir a eficácia do composto na inibição de qualquer função bioquímica ou biológica.

2.4 Análise Estatística

Para avaliar a significância das curvas de crescimento com e sem composto, foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism, opção Dose- response- x is log (dose), analyse xy analysis e non linear regression.

CAPÍTULO III

Resultados

3. Resultados

3.1 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória em Bactérias

Com o objetivo de caracterizar a atividade antibacteriana, foram analisadas as taxas de crescimento das bactérias. Estas foram determinadas na presença de líquidos iônicos com atividade biológica.

Tabela 3 - Tabela representativa das taxas de crescimento das bactérias ATCC 6593, MRSA, ATCC 25911, CTX M2, CTX M9.

BACTÉRIAS					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		
	ATCC 6593	MRSA	ATCC 25911	CTX M2	CTX M9
[C₂OHMIM] [AMX]	Sem MIC na gama de concentrações testadas	Sem MIC na gama de concentrações testadas	Sem MIC na gama de concentrações testadas	50 µM	50 µM
[CH] [AMX]	Sem MIC na gama de concentrações testadas	0.5 µM	0.5 µM	500 µM	500 µM

No que respeita às bactérias da estirpe das *Staphylococcus aureus* o composto [C₂OHMIM] [AMX] não mostra atividade em nenhuma das espécies, pois apresenta crescimento em todas as concentrações, porém o composto [CH] [AMX] é ativo na espécie MRSA.

No caso das bactérias da estirpe da *Escherichia coli* o composto [C₂OHMIM] [AMX] tem atividade na estirpe CTX M2 e CTX M9 e o composto [CH] [AMX] é ativo em todas as espécies testadas.

3.2 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória em Leveduras

Com o objetivo de caracterizar a atividade das leveduras, foram analisadas as suas taxas de crescimento no teste de microdiluição. Esta atividade foi determinada na presença de líquidos iônicos com atividade biológica.

Tabela 4 - Tabela representativa das taxas de crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

<i>S.cerevisiae</i>	Concentração mínima inibitória
[TMGH] [AMP]	500µM
[DBUH][AMP]	0.5 µM
[TMGH][NOR]	500 µM
[DBUH][NOR]	Sem MIC na gama de concentrações testadas
[TMGH][CIP]	50 µM
[DBUH][CIP]	Sem MIC na gama de concentrações testadas

No que respeita à *S. cerevisiae* os compostos [TMGH] [AMP], [DBUH][AMP], [TMGH][NOR] e [TMGH][CIP] são ativos.

3.3 Viabilidade/ Proliferação Celular

As culturas celulares foram tratadas com os diferentes LIs e com base na viabilidade/proliferação celular observada em cada condição experimental, foram calculados os valores de IC50 aos dias 1 e 3, como mostram as tabelas 5 e 6, respetivamente.

Tabela 5 - Valores de IC50 obtidos após 1 dia de cultura

	Dia 1					
	IC50 /μM					
Composto/ Linha Celular	Fibroblastos	RKO	T47D	MG63	A549	Hep62
[TMGH] [AMP]	144,1	a)	a)	a)	781,8	a)
[DBUH] [AMP]	0,5604	NC	a)	2,894	840,3	NC
[TMGH] [NOR]	a)	a)	a)	a)	a)	160,4
[DBUH] [NOR]	430,4	142,5	2543	10,64	a)	90,06
[TMGH] [CIP]	a)	a)	NC	345,9	276,7	a)
[DBUH] [CIP]	NC	6,946	30,66	6,185	6,049	a)

a) não determinado na gama de concentrações testadas; NC- Não conforme

Tabela 6 - Valores de IC50 obtidos ao 3º dia de cultura

	Dia 3					
	IC50 /μM					
Composto/ Linha Celular	Fibroblastos	RKO	T47D	MG63	A549	Hep62
[TMGH] [AMP]	5,659	a)	NC	NC	9,443	a)
[DBUH] [AMP]	3,128	a)	NC	NC	392	NC
[TMGH] [NOR]	a)	a)	a)	a)	139,6	a)
[DBUH] [NOR]	0,7829	a)	a)	112,5	353,5	a)
[TMGH] [CIP]	a)	394,7	364,3	a)	a)	NC
[DBUH] [CIP]	340,6	a)	554,4	a)	a)	444,1

a) não determinado na gama de concentrações testada; NC- Não conforme

Após análise dos resultados observa-se que os diferentes LIs apresentaram efeitos diferenciais nas diferentes linhas celulares, e nos diferentes períodos de cultura testados. Em relação ao dia 1 (tabela 5), apenas o composto [DBUH] [NOR] apresentou uma citotoxicidade mais elevada nas linhas celulares, quando comparado com os fibroblastos (exceto no caso a linha celular T47D, para a qual apresentou menor citotoxicidade). Na tabela 5, apresenta-se o comportamento das diferentes culturas celulares suplementadas com o LI [DBUH] [NOR].

Quanto ao dia 3 (tabela 6), os resultados obtidos, juntamente com a incapacidade de determinar vários valores de IC50 sugerem que nenhum dos LIs apresenta uma maior citotoxicidade para as células tumorais.

Atendendo a estes resultados, parece que a presença do catião DBUH terá mais atividade.

O aumento do tamanho e forma do anel bicíclico também parece ajudar nesta atividade.

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

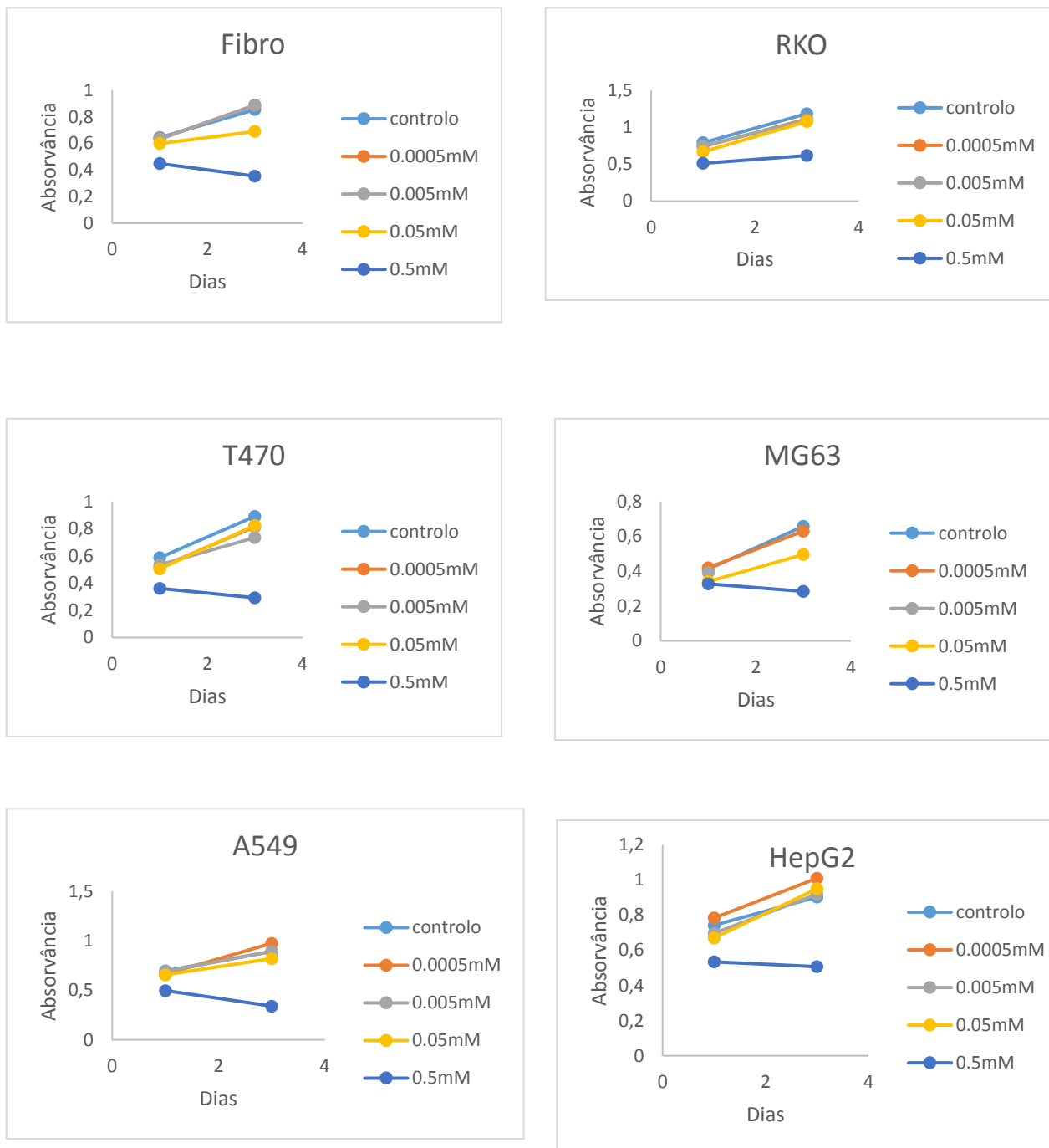


Figura 10 - Gráficos ilustrativos dos resultados obtidos pelo composto [DBUH] [NOR] ao dia 1 e ao dia 3

3.4 Vias de sinalização Celular utilizadas no estudo da atividade celular

Após terem sido determinados os valores de IC50 para os diferentes LIs, foi efetuada uma caracterização da modulação de diferentes vias de sinalização por parte dos mesmos. Para tal, as culturas celulares foram tratadas com diferentes inibidores dessas vias de sinalização, e a resposta celular foi avaliada em função da viabilidade/proliferação celular, avaliada aos dias 1 e 3.

Tabela 7 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular dos fibroblastos.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	Fibroblastos
U	Controlo	98.7%
P		54.9%
SP		91.7%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	91.4%
P		33.9%
SP		84.9%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	86.8%
P		40.9%
SP		106.7%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	95.6%
P		34.8%
SP		96.8%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	96.6%
P		60.3%
SP		84.6%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	98.6%
P		45.1%
SP		116%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	86.5%
P		49.7%
SP		115.3%

Na ausência de LIs, ao dia 3 os inibidores U0126 e SP600125 aparentaram não afetar significativamente a resposta celular dos fibroblastos; por outro lado, o inibidor PDTC promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do líquido iônico [TMGH] [AMP], a suplementação com PDTC causou uma diminuição adicional da resposta celular. Também na presença do LI [DBUH] [AMP], a suplementação com PDTC causou uma diminuição adicional da resposta celular. Por sua vez, na presença dos líquidos iônicos [TMGH] [NOR], [DBUH] [NOR], [TMGH] [CIP] e [DBUH] [CIP] se verificou que a suplementação com PDTC causou uma diminuição adicional da resposta celular.

Tabela 8 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular RKO.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	RKO
U	Controlo	87.5%
P		95.7%
SP		64%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	96.9%
P		87.9%
SP		84.4%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	115.6%
P		116.3%
SP		110.1%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	108.9%
P		73.4%
SP		102.9%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	83.7%
P		91.8%
SP		92.6%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	112.8%
P		106.6%
SP		107.3%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	103.9%
P		126.3%
SP		123.7%

Na ausência de LIs, ao dia 3 os inibidores U0126 e PDTC mostraram não afetar a resposta celular dos fibroblastos, porém, o inibidor SP600125 possibilitou uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do LI [TMGH] [AMP], a suplementação com SP600125 causou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [DBUH] [AMP] verificou-se que nenhum dos inibidores parece afetar significativamente a resposta celular. Por sua vez, quando [TMGH] [NOR] presente a suplementação com PDTC causou uma diminuição adicional na resposta celular. O líquido iônico [DBUH] [NOR] quando presente mostrou diminuição adicional na resposta celular com suplementação por U0126. No caso do LI [TMGH] [CIP] verificou-se que

nenhum dos inibidores afetou significativamente a resposta celular bem como no caso do LI [DBUH] [CIP].

Tabela 9 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular T47D.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	T47D
U	Controlo	101.8%
P		93%
SP		82.9%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	96.3%
P		88.4%
SP		71.3%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	97.4%
P		53.9%
SP		82.1%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	71.8%
P		48.9%
SP		65.7%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	73.7%
P		78.9%
SP		65.5%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	125.4%
P		127.7%
SP		110.4%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	96.7%
P		75.4%
SP		105.9%

Na ausência de líquidos iônicos ao dia 3 os inibidores U0126 e PDTC mostraram não afetar a linha celular dos fibroblastos, porém o inibidor SP600125 promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do LI [TMGH] [AMP] a suplementação com SP600125 causou uma diminuição adicional da resposta celular. Por sua vez, na presença dos líquidos iônicos [DBUH] [AMP] e [TMGH] [NOR] a suplementação com PDTC causou uma diminuição adicional da resposta celular. No caso do [DBUH] [NOR], foi a suplementação com SP600125 que causou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [TMGH] [CIP] nenhuma das vias teve

relevância. Por fim, na presença do LI [DBUH] [CIP] a suplementação com PDTC causou diminuição adicional da resposta celular.

Tabela 10 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular MG63.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	MG63
U	Controlo	117.9%
P		119%
SP		91.4%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	133.9%
P		106.1%
SP		91.7%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	110.8%
P		113.3%
SP		107.4%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	107.2%
P		93.5%
SP		144.7%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	99.7%
P		104.7%
SP		106.5%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	123.4%
P		113.5%
SP		95.9%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	114.5%
P		119.5%
SP		123.8%

Na ausência de LIs, ao dia 3 apenas o inibidor SP600125 aparentou promover uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do líquido iónico [TMGH] [AMP], a suplementação com SP600125 causou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [DBUH] [AMP], nenhum dos inibidores causou uma diminuição adicional da resposta celular. Por sua vez, na presença do líquido iónico [TMGH] [NOR], a suplementação com PDTC promoveu uma diminuição da resposta

celular. No caso do LI [DBUH] [NOR], nenhum dos inibidores mostrou ter relevância na resposta celular. No caso do LI [TMGH] [CIP], a suplementação com SP600125 promoveu uma diminuição adicional da resposta celular. Por fim, na presença do LI [DBUH] [CIP] nenhum dos inibidores se mostrou relevante na resposta celular.

Tabela 11 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular A549.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	A459
U	Controlo	94.2%
P		86.7%
SP		100.5%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	94.5%
P		97.3%
SP		86.4%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	99.8%
P		100.2%
SP		113.9%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	93.8%
P		95.4%
SP		73.6%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	77.5%
P		111%
SP		93.9%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	113.9%
P		102.9%
SP		106.6%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	106.7%
P		105.8%
SP		108.3%

Na ausência de LIs, ao dia 3 o inibidor PDTC promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do líquido iônico [TMGH] [AMP], a suplementação com SP600125 causou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [DBUH] [AMP], nenhum dos inibidores testados afetou a resposta celular.

Na presença do LI [TMGH] [NOR], a suplementação com SP600125 promoveu uma diminuição adicional da resposta celular. Por sua vez, na presença do LI [DBUH] [NOR] a suplementação com U0126, causou uma diminuição adicional da resposta celular. Por fim, na presença dos líquidos iônicos [TMGH] [CIP] e [DBUH] [CIP] nenhum dos inibidores teve relevância na resposta celular.

Tabela 12 - Caracterização da influência de algumas vias de sinalização na viabilidade/proliferação da linha celular Hep62.

Dia 3		
Inibidores das Vias de Sinalização	Compostos/ Linha Celular	Hep62
U	Controlo	97.9%
P		91.7%
SP		70.3%
U	[TMGH] [AMP] 0,5µM	113.5%
P		100.8%
SP		73.2%
U	[DBUH] [AMP] 50µM	92.4%
P		83.4%
SP		70.3%
U	[TMGH] [NOR] 0,5mM	82.4%
P		83.7%
SP		68.4%
U	[DBUH] [NOR] 0,5mM	75.1%
P		83.8%
SP		72.5%
U	[TMGH] [CIP] 0,5mM	100.5%
P		11.4%
SP		86.8%
U	[DBUH] [CIP] 5µM	108. 2%
P		99%
SP		93.9%

Na ausência de LIs, ao dia 3 os inibidores U0126 e SP600125 aparentaram não afetar significativamente a resposta celular dos fibroblastos; por outro lado, o inibidor SP600125 promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. Na presença do

LI [TMGH] [AMP] a suplementação com SP600125 causou uma diminuição adicional da resposta celular. Por sua vez, na presença do líquido iônico [DBUH] [AMP], a suplementação com SP600125 possibilitou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [TMGH] [NOR], a suplementação com SP600125 promoveu uma diminuição adicional da resposta celular. No caso do [DBUH] [NOR], foi a suplementação com SP600125 que causou uma diminuição adicional da resposta celular. Na presença do LI [TMGH] [CIP], foi a suplementação com PDTC que promoveu uma diminuição adicional da resposta celular. Por fim, na presença do LI [DBUH] [CIP] a suplementação com SP600125 causou diminuição adicional da resposta celular.

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

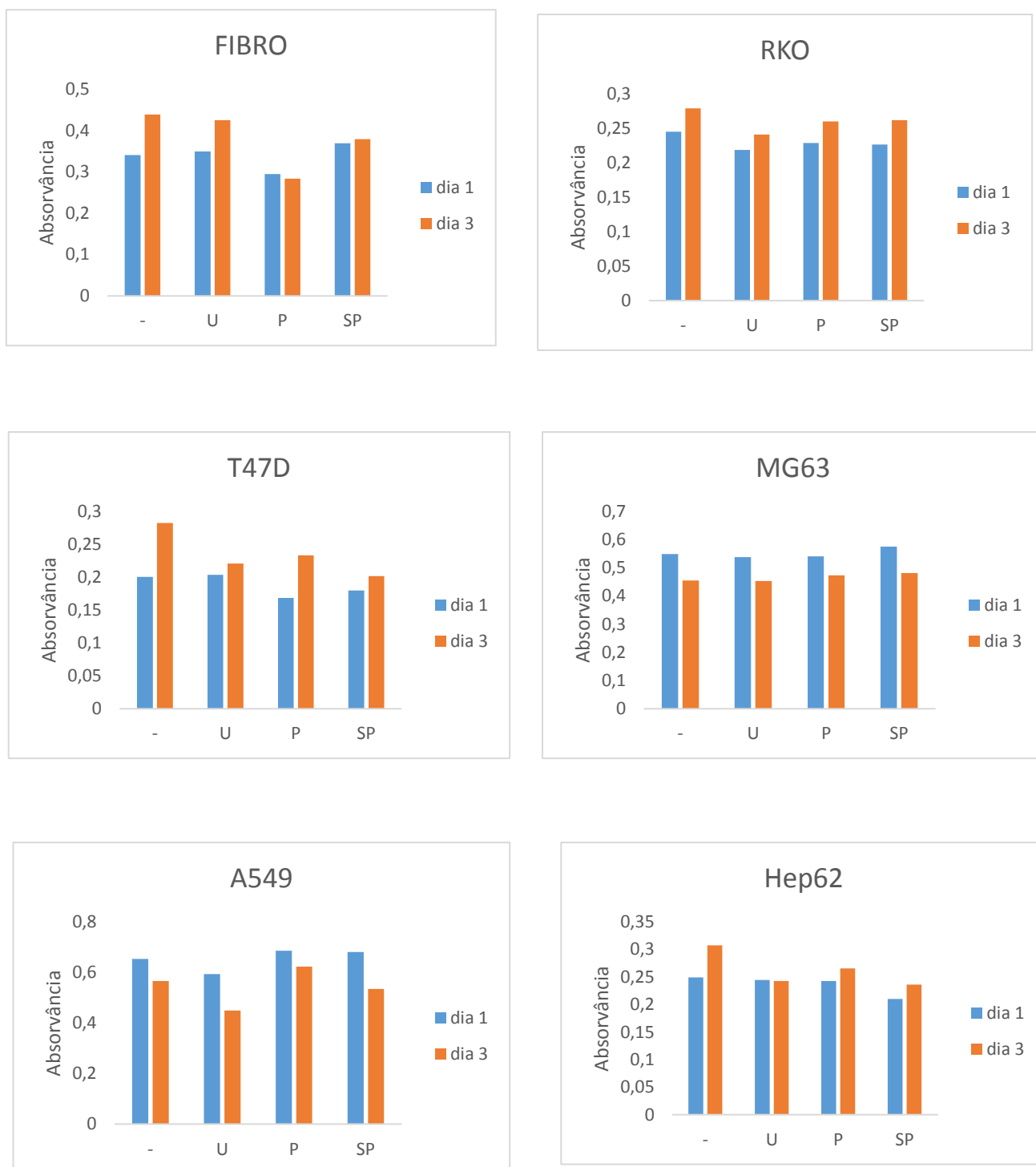


Figura 11 - Gráficos ilustrativos dos resultados obtidos relativamente às vias de sinalização pelo composto MD ao dia 1 e ao dia 3.

CAPÍTULO IV

Discussão

4. Discussão

Bactérias

De forma a quantificar a atividade bacteriana dos compostos em estudo, procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória. Dos compostos testados (tabela 3), e pelos resultados obtidos, verificamos que o composto [CH][AMX] apresenta melhores resultados para as bactérias em estudo do que o composto [C₂OHMIM] [AMX].

No que respeita à família dos *Staphylococcus* apenas o [CH][AMX] apresenta atividade na estirpe MRSA. Este facto, pode dever-se a constituição destas bactérias, pois são compostas por peptidoglicano. O peptidoglicano funciona como barreira de proteção para entrada e saída de nutrientes e outros componentes.

Por sua vez, as gram negativas apresentam na membrana o LPS, que lhes permite manter a integridade estrutural e protege as bactérias de possíveis ataques químicos, isto é, as bactérias têm a capacidade de reconhecer alguns componentes ao tentarem penetrar na bactéria e impedem a sua entrada. No caso das gram – o composto [CH][AMX] foi ativo em todas as espécies testadas.

Também existe uma outra razão plausível que justifique os resultados com o composto em questão, uma vez que, a colina é um nutriente essencial ao metabolismo celular e se encontra em lípidos, que por sua vez, se encontram na membrana celular.

O composto [C₂OHMIM] [AMX] não apresenta atividade na família dos *Staphylococcus*, porém, apresenta atividade em duas das espécies da *E.coli*. Neste caso, apesar deste composto ser mais tóxico que o anterior pode concluir-se que a combinação entre o catião e o anião pode não ser a mais indicada, pois a amoxicilina, sendo um beta-lactâmico capaz de inibir a síntese da parede celular não conseguiu ter atividade em nenhuma das espécies gram positivas. Porém, como nas gram negativas a parede celular é menos espessa já poderá justificar a presença de atividade deste composto.

Tendo em conta os resultados apresentados, verifica-se que o composto [CH][AMX] poderá ser uma opção viável na conquista de tratamentos inovadores para o cancro.

Leveduras

Como já sabemos a *S.cerevisiae* é uma levedura bastante relevante a nível laboratorial, pois é um eucariota simples de fácil cultivo e manipulação. Esta já foi usada em diferentes estudos e auxiliou na pesquisa de várias doenças bem como, no estudo de pormenores científicos ao nível da genética. Dos seis compostos em estudo, quatro mostraram viabilidade no estudo com esta levedura o que revela que esta poderá ser um possível caminho a seguir para atingir novos objetivos na área da investigação. Os quatro compostos que reagiram foram [TMGH] [AMP], [DBUH] [AMP], [TMGH] [NOR] e [TMGH] [CID].

No que respeita ao anião verificou-se que o facto de ser beta-lactâmico ou uma fluoroquinolona não influenciou, uma vez que nos quatro compostos obtidos os resultados estão equilibrados nesse aspeto. Porém ao nível do catião, o TMGH^+ parece ser melhor opção. Segundo a literatura ambos os aniões têm a mesma funcionalidade e características bastante similares, sendo que este tem a vantagem de ser economicamente mais favorável relativamente ao DBUH^+ .

Viabilidade/ Proliferação celular dos LIs baseados em Beta-lactâmicos e Fluoroquinolonas

Um dos objetivos do presente trabalho experimental foi avaliar o efeito de LIs baseados em beta-lactâmicos e fluoroquinolonas na viabilidade/proliferação de diferentes linhas celulares tumorais. Os resultados obtidos foram tratados matematicamente, de forma a serem determinados os respetivos valores de IC50.

De um modo geral, a maior parte dos compostos estudados apresentou uma toxicidade igual ou superior para as células não neoplásicas que foram utilizadas como controlo (fibroblastos de gengiva). De facto, de entre todos os LIs testados, apenas o composto [DBUH] [NOR] induziu uma resposta celular que se traduziu num valor de IC50 significativamente mais baixo para várias linhas celulares tumorais (todas as analisadas, com exceção da linha celular T47D), quando comparado com o obtido com os fibroblastos de gengiva. Uma vez que o parâmetro IC50 diz respeito à concentração mínima necessária para promover uma inibição do crescimento de 50%, daí se depreende

que quanto mais baixo for este valor, maior será a citotoxicidade do respectivo composto químico. Sendo assim, o composto [DBUH] [NOR] aparentou ser mais tóxico para várias linhas celulares tumorais do que para os fibroblastos.

O [DBUH] [NOR] é o composto mais promissor neste estudo, sendo que, a presença do catião DBUH parece ajudar no aumento da toxicidade para as células tumorais. Também a presença de um anel bicíclico parece ajudar no aumento desta atividade biológica.

Estudo das Vias de sinalização implicadas no comportamento das diferentes linhas celulares.

Após se ter caracterizado o potencial citotóxico dos diferentes LIs, procedeu-se a uma avaliação do efeito que os mesmos têm na modulação de diferentes vias de sinalização importantes para a formação e desenvolvimento neoplásico, nomeadamente, as vias MEK, NFkB e JNK. Para tal, as culturas celulares foram tratadas com diferentes inibidores de vias de sinalização, e mantidas na ausência ou presença dos Lis. Foi possível observar que os diferentes LIs apresentaram efeitos diferenciais nas vias de sinalização analisadas. Globalmente, no caso dos fibroblastos, o efeito mais evidente foi ao nível da via NFkB, que aparentou adquirir relevância no comportamento celular na presença de todos os LIs testados, com exceção do [DBUH] [NOR]. Quanto à linha celular RKO, o efeito mais evidente ocorreu ao nível da via JNK, que aparentou perder relevância quando as culturas celulares foram suplementadas com os LIs. Considerando a linha celular T47D, os diferentes LIs promoveram de forma diferencial um aumento da relevância das 3 vias de sinalização testadas. Em relação à linha celular MG63, não se verificou uma modulação significativa das vias de sinalização analisadas. Uma situação semelhante foi observada genericamente na linha celular HepG2, apesar de neste caso o composto [TMGH] [NOR] e o composto [DBUH] [NOR] terem provocado um aumento do contributo das vias JNK e MEK, respetivamente. Por último, as principais vias afetadas pelos LIs, no caso da linha celular HepG2 foram as vias MEK e NFkB, cujo papel na resposta celular foi aumentado aquando da suplementação com os LIs [DBUH] [AMP], [TMGH] [NOR] e [DBUH] [NOR].

Considerando o LI que apresentou uma maior citotoxicidade específica contra as células tumorais, o composto [DBUH] [NOR], observou-se que o seu efeito pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pela sua capacidade de modular a via de sinalização MEK.

Segundo alguns estudos efetuados, verificou-se que muitos câncros humanos apresentam hiperativação da via MAPK, mais comumente através de mutações em genes como RAS, BRAF, CRAF ou MEK1. Cerca de 30% de todos os câncros humanos, incluindo cerca de 90% do cancro de pâncreas e 45% dos casos de cancro colorretal, apresentam mutações ativadoras em genes da família RAS (HRAS, K-RAS e N-RAS), sendo K-RAS a isoforma mutante mais frequente (Rauch et al., 2016). Os componentes desta via são, portanto, compostos muito atraentes para o desenvolvimento de possíveis medicamentos antitumorais.

De um modo geral, verificou-se que este trabalho apresenta compostos com potencial de poderem vir a tornar-se possíveis medicamentos para o tratamento de doenças oncológicas e assim evitar a exposição dos doentes a tratamentos agressivos como a quimioterapia. Porém, mais estudos têm de ser efetuados com os compostos em questão de forma a clarificar os seus mecanismos de ação como LI-IFA.

CAPÍTULO V

Conclusão

5. Conclusão

Atualmente, a indústria farmacêutica está a enfrentar inúmeros problemas e desafios na descoberta de medicamentos inovadores e eficazes bem como as suas possíveis aplicações terapêuticas. O desenvolvimento de estratégias que utilizam LIs é, portanto, uma via promissora para a resolução da questão, uma vez que, a combinação de propriedades biológicas favoráveis com o facto de que o medicamento pode estar no estado líquido pode ser uma característica importante.

Primeiramente começamos por verificar a viabilidade dos compostos que pretendíamos estudar em leveduras, nomeadamente, na *S.cerevisiae*. No estudo em questão, os compostos, [TMGH] [AMP], [DBUH] [AMP], [TMGH] [NOR] e [TMGH] [CIP] revelaram ter atividade com a mesma.

Como podemos verificar este trabalho mostrou bastante relevância no estudo de possíveis compostos antitumorais. O composto [DBUH] [NOR] manifestou-se como o mais importante. Este induziu uma resposta celular que se traduziu num valor de IC50 significativamente mais baixo para várias linhas celulares tumorais, quando comparado com o obtido com os fibroblastos de gengiva, depreendendo-se que quanto mais baixo for este valor, maior será a citotoxicidade do respetivo composto químico. Sendo assim, o composto [DBUH] [NOR] aparentou ser mais tóxico para várias linhas celulares tumorais do que para os fibroblastos.

Após se ter caracterizado o potencial citotóxico dos diferentes LIs, procedeu-se a uma avaliação do efeito que os mesmos têm na modulação de diferentes vias de sinalização importantes para a formação e desenvolvimento neoplásico, nomeadamente, as vias MEK, NFkB e JNK. No caso do composto [DBUH] [NOR], observou-se que o seu efeito pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pela sua capacidade de modular a via de sinalização MEK.

Porém, apesar dos estudos efetuados, são necessários muitos mais de forma a clarificar os mecanismos de ação destes LIs-IFAs e mais tarde poder aplicá-los como possíveis medicamentos antitumorais.

Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas

CAPÍTULO VI

Bibliografia

5. Bibliografia

- Bennett, L. B. (2006). c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanisms in respiratory disease.
- Bertão, A. M. S., & Saridakis, H. O. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): principal virulence factors and epidemiology.
- Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M., Caldeira, J., Arneborg, N., Albergaria, H. (2016). Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*.
- Bufalo, C. M., Radosevic, K., Redovnikovic, I. R., Halambec, J., & Srcek, V. G. (2014). A brief overview of the potencial environmental hazards of ionic liquids In: ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY.
- Carson, L., Chau, P. K. W., Earle, M. J., Gilea, M. A., Gilmore, B. F., Gorman, S. P., Seddon, K. R. (2009). Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(4), 492-497. doi:10.1039/b821842k
- Cole, M. R., Li, M., EL-Zahab, B., Janes, M., Hayes, D., & Warner, I. M. (2011). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of b-Lactam Antibiotic-Based Imidazolium- and Pyridinium-Type Ionic Liquids.
- Costa, S. P. F., Justina, V. D., Bica, K., Vasiloiu, M., Pinto, P., & Saraiva, M. (2014). Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri*. *Journal of Hazardous Materials*, 265, 133-141. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.052
- Courvalin, P. (2005). Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction in Very Difficult, Especially about the Future".
- Dias, A. R., Rodrigues, J., Fernandes, M., Ferraz, R., & Prudêncio, C. (2017). The Anticancer Potencial of Ionic Liquids.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer.
- Fan, L.-L., Li, H.-J., & Chen, Q.-H. (2014). Applications and Mechanisms of Ionic Liquids in Whole-Cell Biotransformation.
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). Beta-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance.
- Ferraz, R., Branco, L. C., Marrucho, I. M., Araujo, J. M. M., Rebelo, L. P. N., da Ponte, M. N., Petrovski, Z. (2012). Development of novel ionic liquids based on ampicillin. *Medchemcomm*, 3(4), 494-497. doi:10.1039/c2md00269h
- Ferraz, R., Branco, L. C., Prudencio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Z. (2011). Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemmedchem*, 6(6), 975-985. doi:10.1002/cmcd.201100082
- Ferraz, R., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Santos, M. M., Marrucho, I. M., Rebelo, L. P. N., Branco, L. C. (2015). Antitumor Activity of Ionic Liquids Based on Ampicillin. *Chemmedchem*, 10(9), 1480-1483. doi:10.1002/cmcd.201500142
- Ferraz, R., Noronha, J., Murtinheira, F., Nogueira, F., Machado, M., Prudencio, M., Gomes, P. (2016). Primaquine-based ionic liquids as a novel class of antimalarial hits. *Rsc Advances*, 6(61), 56134-56138. doi:10.1039/c6ra10759a
- Ferraz, R., Prudêncio, C., Vieira, M., Fernandes, R., Noronha, J. P., & Petrovski, Z. (2015). Ionic Liquids Synthesis - Methodologies.

- Ferraz, R., Teixeira, V., Rodrigues, E., Fernandes, R., Prudencio, C., Noronha, J. P., Branco, L. C. (2014). Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. *Rsc Advances*, 4(9), 4301-4307. doi:10.1039/c3ra44286a
- Frade, R. F. M., Matias, A., Branco, L. C., Afonso, C. A. M., & Duarte, C. M. M. (2007). Effect of ionic liquids on human colon carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. *Green Chemistry*, 9(8), 873-877. doi:10.1039/b617526k
- Frade, R. F. M., Matias, A., Branco, L. C., Lourenco, N. M. T., Rosa, J. N., Afonso, C. A. M., & Duarte, C. M. M. (2010). Toxicological Evaluation of Ionic Liquids Effect of Ionic Liquids on Human Colon Carcinoma HT-29 and CaCo-2 Cell Lines. *Ionic Liquid Applications: Pharmaceuticals, Therapeutics, and Biotechnology*, 1038, 135-144.
- Ghosh, S., & Dass, P. F. (2016). Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: a brief review.
- Gilmore, B. F. (2011). *Antimicrobial ionic liquids*: INTECH Open Access Publisher.
- Grimaldi, M. A., Silmeone, E., Festino, L., Vanella, V., Strudel, M., & Ascierio, A. P. (2017). MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors.
- Grunsteins, M., & Gasser, M. S. (2013). Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Guimarães, D., Momesso, L., & Pupo, M. (2010). Anibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next Generation.
- Hooper, C. D. (2001). Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance.
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1-36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Kumar, V., & Malhotra, S. V. (2009). Study on the potencial anti-cancer activity of phophonium and ammonium-based ionic liquids.
- Ledeti, I., Avram, S., Bercean, V., Vlase, G., Vlase, T., Ledeti, A., Dehelean, C. (2015). Solid-State Characterization and Biological Activity of Betulonic Acid Derivatives. *Molecules*, 20(12), 22691-22702. doi:10.3390/molecules201219876
- Lee, D., Park, S. H., Wohlgemuth, G., & Fiehn, O. (2013). Evaluation and Optimization of Metabolome Sample Preparation Methods for *Saccharomyces cerevisiae*
- Liao, T.-T., & Yang, M.-H. (2017). Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: connection between epithelial plasticity and stemness.
- Lu, J. (2012a). Crystallization and transformation of pharmaceutical solid forms.
- Lu, J. (2012b). Crystallization and transformation of pharmaceutical solid forms. doi:DAEAF7C32931
- Lupia, M., & Cavallaro, U. (2017). Ovarian cancer stem cell: still an elusive entity?
- Malhotra, S. V., Kumar, V., Velez, C., & Zayas, B. (2014). Imidazolium-derived ionic salts induce inhibition of cancerous cell growth through apoptosis. *Medchemcomm*, 5(9), 1404-1409. doi:10.1039/c4md00161c
- Marrucho, I. M., Branco, L. C., & Rebelo, L. P. N. (2014). Ionic Liquids in Phamaceutical Applications.
- Marshal, B., & Levy, B. S. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.

- McCubrey, A. J., Steelman, S. L., Chappell, H. W., Abrams, L. S., Wong, W. E., Chang, F., Franklin, A. R. (2006). Roles of the RAF/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.
- Montagner, F., Jacinto, C. R., Signoretti, V., & Gomes, P. (2014). Beta-lactamic Resistance Profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* Species Isolated from Acute Endodontic Infections.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- Nowakonsky, Â., Levy, C., Zoccoli, C., Mamizuka, E., Cavassin, E., & Araújo, M. (2013). *Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Pereira, J. G., & Póvoa, P. (2011). Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of b-lactams.
- Petkovic, M., Seddon, K. R., Rebelo, L. P. N., & Pereira, C. S. (2011). Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1383-1403. doi:10.1039/c004968a
- Rauch, N., Rukhlenko, S. O., Kolch, W., & Kholodenko, N. B. (2016). MAPK Kinase dynamics regulate cell fate decisions and drug resistance.
- Ronnerstrand, B., & Sundell, A. K. (2015). Trust, reciprocity and collective action to fight antibiotic resistance. An experimental approach. Retrieved from
- Russel, A. D., & Hugo, W. B. (1998). *Pharmaceutical microbiology*: Blackwell science. In.
- Samshina, L. J., Barber, S. P., & Rogers, D. R. (2013). Ionic Liquids in drug delivery.
- Santos, A. L., Santos, D. O., Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar.
- Schreiber, D. R., Old, L., & Smyth, J. M. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion.
- Seter, M., Thomson, M. J., Chong, A., MacFarlane, D. R., & Forsyth, M. (2013). Cetrimonium Nalidixate as a Multifunctional Inhibitor to Combat Biofilm Formation and Microbiologically Influenced Corrosion. *Australian Journal of Chemistry*, 66(8), 921-929. doi:10.1071/ch13107
- Shaul, D. Y., & Seger, R. (2006). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions.
- Siddiqui, A. I., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), 16. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Smiglak, M., Pringle, J. M., Lu, X., Han, L., Zhang, S., Gao, H., & MacFarlane, D. R. (2014). Ionic Liquids for energy, materials, and medicine.
- Stoimenovski, J., MacFarlane, R. D., Bica, K., & Rogers, D. R. (2010). Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: A Position Paper.
- Suzuki, S., Horinouchi, T., & Furusawa, C. (2015). Suppression of antibiotic resistance acquisition by combined use of antibiotics.

- Voordeckers, K., & Verstrepen, J. K. (2015). Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yield insight into the molecular mechanisms underlying adaptation.
- Wang, K. W., Chang, W. N., Chang, H. W., Chuang, Y. C., Tsai, N. W., Wang, H. C., & Lu, C. H. (2005). The significance of seizures and other predictive factors during the acute illness for the long-term outcome after bacterial meningitis. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, 14(8), 586-592. doi:10.1016/j.seizure.2005.09.004
- Zhang, H., & Xu, X. (2017). Mutation-promoting molecular networks of uncontrolled inflammation.
- Zhao, H.-F., Wang, J., & To, S.-s. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or Contradiction ? (Review).